

UNIVERSITÄTSFRAUENKLINIK ROSTOCK

DIREKTOR: PROF. DR. MED. HABIL. BERND GERBER

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG
VON VIER VERSCHIEDENEN KOMMERZIELLEN LIGNANEN
AUF HUMANE MAMMAEPITHELZELLEN

INAUGURALDISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN
DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

FRIEDERIKE CHRISTIANE SOLF | GEB. AM 23.08.1991 IN BERLIN
AUS BERLIN

ROSTOCK | 17. AUGUST 2019

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002845

DOKTORARBEIT

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DEKAN: PROF. DR. MED. UNIV. EMIL C. REISINGER

GUTACHTER:

1. GUTACHTER:

PD DR. RER. NAT. HABIL. DAGMAR-ULRIKE RICHTER
FORSCHUNGSLABOR DER UNIVERSITÄTSFRAUENKLINIK UND POLIKLINIK
UNIVERSITÄTSKLINIKUM ROSTOCK

2. GUTACHTER:

PROF. DR. MED. ISABELL WITZEL
KLINIK UND POLIKLINIK FÜR GYNÄKOLOGIE
UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

3. GUTACHTER:

PROF. DR. MED. MAREK ZYGMUNT
KLINIK UND POLIKLINIK FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE
UNIVERSITÄTSMEDIZIN GREIFSWALD

DATUM DER VERTEIDIGUNG: 10. NOVEMBER 2020

INHALTSVERZEICHNIS

SYMBOL- UND ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	XI
I. EINLEITUNG	1
1.1 DIE WEIBLICHE BRUST	1
1.2 DAS MAMMAKARZINOM	2
1.2.1 EPIDEMIOLOGIE	2
1.2.2 ÄTIOLOGIE	3
1.2.2.1 RISIKOFAKTOREN	3
1.2.3 KLASSIFIKATION	7
1.2.4 THERAPIE	8
1.2.5 PROGNOSE	10
1.3 SEXUALHORMONE	11
1.3.1 ESTROGENE	11
1.3.1.1 DIE ESTROGENREZEPTOREN	12
1.3.1.2 WIRKUNG AM KLASSISCHEN ESTROGENREZEPTOR	12
1.3.1.3 ALTERNATIVE SIGNALWEGE	13
1.3.2 PROGESTERON	14
1.3.3 SEXUALHORMONE UND BRUSTKREBS	14
1.4 SELEKTIVE ESTROGENREZEPTOR MODULATOREN	15
1.4.1 TAMOXIFEN	16
1.5 PHYTOESTROGENE	17
1.5.1 LIGNANE	19
1.5.1.1 LIGNANE IN NAHRUNGSMITTELN	19
1.5.1.2 METABOLISIERUNG DER LIGNANE	20
1.5.1.3 WIRKUNG AM KLASSISCHEN ESTROGENREZEPTOR	21
1.5.1.4 ERE-UNABHÄNGIGE WIRKUNGSMECHANISMEN	21

1.5.1.5 LIGNANE UND BRUSTKREBS	22
II. ZIELSETZUNG.....	24
III. MATERIAL UND METHODEN	25
3.1 MATERIAL.....	25
3.1.1 ZELLINIEN.....	25
3.1.2 ZELLKULTURMEDIENT UND ZUSÄTZE	26
3.2 METHODEN.....	27
3.2.1 KULTIVIERUNG DER ZELLEN.....	27
3.2.2 VORBEREITUNG DER TESTVERFAHREN	28
3.2.2.1 BESTIMMUNG DER ZELLZAHL	29
3.2.2.2 SUBSTANZVORBEREITUNG	30
3.2.3 IMMUNHISTOCHEMIE (IHC)	31
3.2.4 LDH-ZYTOTOXIZITÄTEST	34
3.2.5 BRDU-PROLIFERATIONSTEST	37
3.2.6 UNTERSUCHUNG DES OXIDATIVEN STRESSES UND DES ZELLMETABOLISMUS	39
3.2.6.1 BESTIMMUNG DES OXIDATIVEN STRESSES.....	39
3.2.6.2 BESTIMMUNG DER GLUKOSEKONZENTRATION	40
3.2.6.3 BESTIMMUNG DES PH-WERTES.....	40
3.2.6.4 DURCHFÜHRUNG DER STOFFWECHSEL-UNTERSUCHUNGEN	41
3.2.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG	42
IV. ERGEBNISSE.....	43
4.1 IMMUNHISTOCHEMIE:	44
4.2 LDH-ZYTOTOXIZITÄTEST	46
4.3 BRDU-ZELLPROLIFERATIONSTEST	50
4.4 OXIDATIVER STRESS UND ZELLMETABOLISMUS.....	54
4.4.1 OXIDATIVER STRESS.....	54
4.4.2 GLUKOSEVERBRAUCH	58
4.4.3 PH-WERT.....	62

V. DISKUSSION	66
5.1 IMMUNHISTOCHEMIE	67
5.2 EINFLUSS DER LIGNANE AUF ZYTOTOXIZITÄT, ZELLPROLIFERATION, OXIDATIVEN STRESS UND ZELLSTOFFWECHSEL <i>IN-VITRO</i>	68
5.2.1 ZYTOTOXISCHE WIRKUNG DER LIGNANE <i>IN-VITRO</i>	68
5.2.2 EINFLUSS DER LIGNANE AUF DIE ZELLPROLIFERATION <i>IN-VITRO</i>	69
5.2.3 EINFLUSS DER LIGNANE AUF DEN OXIDATIVEN STRESS UND ZELLSTOFFWECHSEL <i>IN-VITRO</i>	71
5.2.3.1 EINFLUSS DER LIGNANE AUF DEN OXIDATIVEN STRESS DER ZELLEN	71
5.2.3.2 EINFLUSS DER LIGNANE AUF DEN GLUKOSEVERBRAUCH DER ZELLEN.....	72
5.2.3.3 EINFLUSS DER LIGNANE AUF DEN PH-WERT DER ZELLEN	73
5.3 EINFLUSS VON 17B-ESTRADIOL	74
5.4 EINFLUSS VON TAMOXIFEN	76
5.5 DIE ROLLE DES ESTROGENREZEPTORS BETA	78
5.6 METHODIK	81
5.7 LIGNANE ALS PRÄVENTIVE ODER THERAPEUTISCHE OPTION BEIM MAMMAKARZINOM?	82
VI. ZUSAMMENFASSUNG	88
VII. AUSBLICK.....	90
VIII. THESEN	91
IX. LITERATURVERZEICHNIS	93
X. ANHANG	124
XI. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	128
XII. LEBENS LAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
XIII. DANKSAGUNG	129

SYMBOL- UND ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AF-1	Aktivierungsfunktion 1
AF-2	Aktivierungsfunktion 2
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BMI	<i>body mass index</i>
BRCA	<i>breast cancer (gene)</i>
BRCA1	<i>breast cancer (gene) 1</i>
BRCA2	<i>breast cancer (gene) 2</i>
BrdU	Bromdeoxyuridin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DCIS	<i>ductal carcinoma in situ</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
E2	Estradiol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
END	Enterodiol
ENL	Enterolacton
ERE	Estrogen-responsive Elemente
ER α	Estrogenrezeptor alpha
ER β	Estrogenrezeptor beta
EtOH	Ethanol
FKS	fetales Kälberserum
GOD	Glukoseoxidase
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Ham`s	<i>Hams Nutrient Mixtures</i>
HCL	Salzsäure
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HET	Hormonersatztherapie
HMEC	<i>Human Mammary Epithelial Cells</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IHC	Immunhistochemie
KI	Konfidenzintervall
LCIS	<i>lobular carcinoma in situ</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
MATA	Matairesinol
MP	Mikrotiterplatte
NK 1	Negativkontrolle 1
NK 2	Negativkontrolle 2
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PK	Positivkontrolle
PR	Progesteronrezeptor
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDG	Secoisolariciresinol-Diglykosid
SECO	Secoisolariciresinol
SERM	Selektiver Estrogenrezeptor Modulator
SHBG	Sexhormonbindendes Globulin
Tab.	Tabelle
UFK	Universitätsfrauenklinik
UpM	Umdrehungen pro Minute

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: a) Schematischer Saggitalschnitt der weiblichen Brust; b) Lichtmikroskopische Aufnahme der epithelialen Anteile der Brustdrüse (Orginalpräparat von W.Bargmann 1995; Rhesus-Äffin, Färbung: Hämatoxylin; Lupenvergrößerung); Originalquelle Lüllmann-Rauch 2015 [163], modifiziert nach Thieme via medici 2018 [269].....	1
Abb. 2: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten von Brustkrebs 2012 im weltweiten Vergleich (je 100.000), modifiziert nach <i>International Agency for Research</i> 2015 [119].....	2
Abb. 3: Strukturformeln wichtiger Vertreter der Sexualhormone, modifiziert nach Birkenheuer [25, 26]	11
Abb. 4: Domänenstruktur der Estrogenrezeptoren im Vergleich, angelehnt an Leidenberger <i>et al.</i> 2014 [152] und Aktories 2017 [8]	12
Abb. 5: Vereinfachte schematische Darstellung der Estrogen-vermittelten Signaltransduktion; a) ERE-abhängige klassische Estrogenwirkung; b) ERE-unabhängige direkte Interaktion mit Transkriptionsfaktoren (TF); c) Aktivierung von Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (TKR) wie den EGFR oder Proteinkinasen (PK) wie Src; d) Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPGR), z.B. Gq, Gi, Gs; e) direkte Aktivierung von Ionenkanälen (IK), z.B. Na ⁺ - und Ca ²⁺ - Kanäle; angelehnt an Aktories 2017 [8]	13
Abb. 6: Strukturformeln von 17 β -Estradiol, Tamoxifen und Raloxifen im Vergleich, modifiziert nach Birkenheuer [26] und STEMCELL Technologies 2018 [256, 257].....	15
Abb. 7: Strukturformel unterschiedlicher Phytoestrogene im Vergleich nach Phenol-Explorer 2015 [208]	17
Abb. 8: Metabolisierung ausgewählter Lignane, angelehnt an Heinonen <i>et al.</i> 2001 [108] ..	20
Abb. 9: Lichtmikroskopische Aufnahme der Zelllinien (Vergrößerung 20 x); a) Zelllinie MCF-12A; b) HMEC; c) Zelllinie Hs 578T. Jeweilige Zellen exemplarisch mit schwarzem Pfeil markiert.....	25
Abb. 10: a) Schematische Darstellung einer Zellenzählkammer, modifiziert nach Neuendorf 2015 [196]; b) Schematische Darstellung eines Zählnetzes nach Bürker; c) Mäanderförmiges Auszählen der vitalen Zellen in der Zählkammer, in Anlehnung an Gstraunthaler und Lindl 2013 [98]	29
Abb. 11: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Reaktion, angelehnt an <i>Vector Laboratories</i> [279]	32
Abb. 12: Reaktionsschema des LDH-Testes, modifiziert nach <i>Roche Applied Science</i> 2005 [228]	34

Abb. 13: Bestückungs-Schema der Mikrotiterplatten; Tam = Tamoxifen, E2 = Estradiol, END = Enterodiol, ENL = Enterolacton, 1–50 = Substanzkonzentration [µg/ml], MEZ = Medium + Ethanol + Zellen (NK 2), MZ = Medium + Zellen (NK 1), M = Medium, Tri = Triton (PK)	36
Abb. 14: Strukturelle Ähnlichkeit von Thymidin und BrdU, modifiziert nach <i>Bio-Rad Laboratories</i> 2018 [25].....	37
Abb. 15: Reaktionsschema des <i>Hydrogen Peroxide Assays</i> , angelehnt an Held 2003 [109]39	
Abb. 16: Reaktionsschema der Glukosebestimmung, modifiziert nach Zier <i>et al.</i> 1988 [309]40	
Abb. 17: Immunhistochemie der Zelllinie MCF-12A; Lichtmikroskopische Aufnahme; a) Estrogenrezeptor α positiv (Vergrößerung 20 x); b) Estrogenrezeptor β positiv (Vergrößerung 10 x); c) Progesteronrezeptor positiv (Vergrößerung 20 x); d) Negativkontrolle (Vergrößerung 20 x), Positive Zellen exemplarisch mit schwarzem Pfeil markiert	44
Abb. 18: Immunhistochemie der HMEC; Lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 10 x); a) Estrogenrezeptor α positiv; b) Estrogenrezeptor β positiv; c) Progesteronrezeptor positiv; d) Negativkontrolle. Zur Verfügung gestellt vom Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock. Positive Zellen exemplarisch mit schwarzem Pfeil markiert.....	45
Abb. 19: Immunhistochemie der Zelllinie Hs 578T; Lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 10 x); a) Estrogenrezeptor α negativ; b) Estrogenrezeptor β positiv; c) Progesteronrezeptor negativ; d) Negativkontrolle. Positive Zellen exemplarisch mit schwarzem Pfeil markiert.....	45
Abb. 20: Zytotoxische Wirkung der Test- und Kontrollsubstanzen auf die Zelllinie MCF-12A im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17β-Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [µg/ml]; n = 4 x 4	47
Abb. 21: Zytotoxische Wirkung der Test- und Kontrollsubstanzen auf die HMEC im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17β-Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 2 = Medium + Zellen + Ethanol, 1–50 = Substanzkonzentration [µg/ml]; n = 1 x 4	48
Abb. 22: Zytotoxische Wirkung der Test- und Kontrollsubstanzen auf die Zelllinie Hs 578T im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17β-Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [µg/ml]; n = 5 x 4	49

Abb. 23: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf die Proliferation der Zelllinie MCF-12A im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17 β -Estradiol (1 x 10 ⁻⁹ mol/l), Tam = Tamoxifen (1 x 10 ⁻⁴ mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [μ g/ml]; n = 5 x 4.....	51
Abb. 24: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf die Proliferation der HMEC im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17 β -Estradiol (1 x 10 ⁻⁹ mol/l), Tam = Tamoxifen (1 x 10 ⁻⁴ mol/l), NK 2 = Medium + Zellen + Ethanol, 1–50 = Substanzkonzentration [μ g/ml]; n = 1 x 4.....	52
Abb. 25: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf die Proliferation der Zelllinie Hs 578T im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17 β -Estradiol (1 x 10 ⁻⁹ mol/l), Tam = Tamoxifen (1 x 10 ⁻⁴ mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [μ g/ml]; n = 5 x 4.....	53
Abb. 26: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den oxidativen Stress der Zelllinie MCF-12A; E2 = 17 β -Estradiol (1 x 10 ⁻⁹ mol/l), Tam = Tamoxifen (1 x 10 ⁻⁴ mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [μ g/ml]; n = 3.....	55
Abb. 27: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den oxidativen Stress der HMEC; E2 = 17 β -Estradiol (1 x 10 ⁻⁹ mol/l), Tam = Tamoxifen (1 x 10 ⁻⁴ mol/l), NK 2 = Medium + Zellen + Ethanol, 1–50 = Substanzkonzentration [μ g/ml]; n = 1.....	56
Abb. 28: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den oxidativen Stress der Zelllinie Hs 578T; E2 = 17 β -Estradiol (1 x 10 ⁻⁹ mol/l), Tam = Tamoxifen (1 x 10 ⁻⁴ mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [μ g/ml]; n = 1.....	57
Abb. 29: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den Glukoseverbrauch der Zelllinie MCF-12A im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17 β -Estradiol (1 x 10 ⁻⁹ mol/l), Tam = Tamoxifen (1 x 10 ⁻⁴ mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [μ g/ml]; n = 3.....	59
Abb. 30: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den Glukoseverbrauch der HMEC im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17 β -Estradiol (1 x 10 ⁻⁹ mol/l), Tam = Tamoxifen (1 x 10 ⁻⁴ mol/l), NK 2 = Medium + Zellen + Ethanol, 1–50 = Substanzkonzentration [μ g/ml]; n = 3.....	60
Abb. 31: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den Glukoseverbrauch der Zelllinie Hs 578T im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17 β -Estradiol (1 x 10 ⁻⁹ mol/l), Tam = Tamoxifen (1 x 10 ⁻⁴ mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [μ g/ml]; n = 3.....	61
Abb. 32: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den pH-Wert im Überstand der Linie MCF-12A; E2 = 17 β -Estradiol (1 x 10 ⁻⁹ mol/l), Tam = Tamoxifen (1 x 10 ⁻⁴ mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [μ g/ml]; n = 4.....	63

Abb. 33: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den pH-Wert im Überstand der HMEC; E2 = 17 β -Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 2 = Medium + Zellen + Ethanol, 1–50 = Substanzkonzentration [μ g/ml]; n = 1.....	64
Abb. 34: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den pH-Wert im Überstand der Linie Hs 578T; E2 = 17 β -Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [μ g/ml]; n = 3.....	65

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Lignangehalt in ausgewählten Nahrungsmitteln (μg / 100 g Feuchtgewicht, *ohne Sesamin) nach Milder <i>et al.</i> 2005 [178] und Thompson <i>et al.</i> 2006 [270]	19
Tab. 2: Verdünnungsreihe der Lignane	31
Tab. 3: Zelllinien	124
Tab. 4: Nährmedien und Zusätze	124
Tab. 5: Test- und Kontrollsubstanzen	124
Tab. 6: Chemikalien, Puffer und Lösungen	125
Tab. 7: Test-Kits	125
Tab. 8: Antikörper	126
Tab. 9: Verbrauchsmaterialien	126
Tab. 10: Geräte	127
Tab. 11: Software	127

I. EINLEITUNG

1.1 DIE WEIBLICHE BRUST

Die Mamma besteht im Wesentlichen aus einem in Binde- und Fettgewebe eingebetteten Drüsen- und Milchgangsystem. Die Glandula mammaria umfasst 10 bis 20 Lobi, die jeweils aus gruppiert angeordneten alveolären Endstücken, den Lobuli, und einem verzweigten System aus Milchgängen, den Ductus lactiferi, zusammengesetzt sind. Sie sind über einen Terminalductus miteinander verbunden. Die Gänge eines Lobus münden jeweils in einen gemeinsamen Ductus lactifer colligens auf der Papilla mammae (Abb. 1) [162].

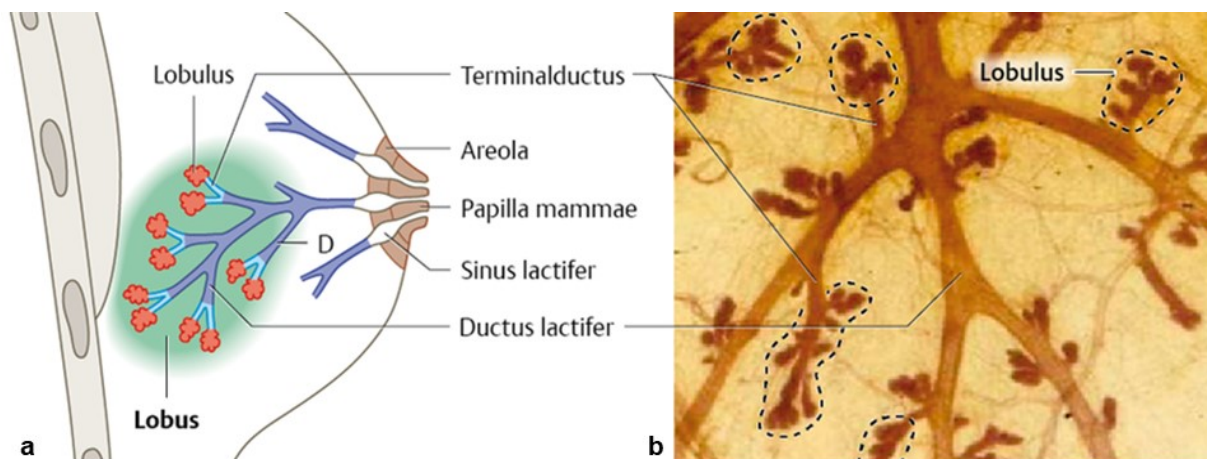


Abb. 1: a) Schematischer Saggitalschnitt der weiblichen Brust; b) Lichtmikroskopische Aufnahme der epithelialen Anteile der Brustdrüse (Originalpräparat von W.Bargmann 1995; Rhesus-Äffin, Färbung: Hämatoxylin; Lupenvergrößerung); Originalquelle Lüllmann-Rauch 2015 [162], modifiziert nach Thieme via medici 2018 [268].

Eine variable Anzahl der Epithelzellen des Brustdrüsengewebes exprimiert Estrogen- und / oder Progesteronrezeptoren [51, 199, 293]. Über diese kommt es während des Menstruationszyklus physiologisch zu einer hormonabhängigen Stimulation der Epithelzellproliferation. Insbesondere zwischen Menarche und erster Schwangerschaft unterliegt so die Brustdrüse starken Veränderungsprozessen, wodurch diese Phase mit einer hohen Vulnerabilität gegenüber endogenen und exogenen Karzinogenen verbunden ist [53].

Nach der Menopause kommt es in Folge sinkender Hormonspiegel zu einer Atrophie von Lobuli und Bindegewebe (Altersinvolution) und einer Zunahme des relativen Fettanteils [162]. Sowohl das Gangsystem als auch einzelne Lobuli bleiben bestehen [162] und stellen insbesondere bei fehlendem Absinken der Sexualhormonspiegel eine potenzielle Risikostruktur für die Entwicklung eines Mammakarzinoms in der Postmenopause dar.

1.2 DAS MAMMAKARZINOM

1.2.1 EPIDEMIOLOGIE

Laut Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts erkrankten im Jahr 2014 in Deutschland 69.220 Frauen und 650 Männer an Brustkrebs, 17.804 Menschen starben daran. Frauen erkrankten etwa 100 Mal häufiger als Männer [305]. Weltweit wurden im Jahr 2012 rund 1,67 Millionen Neuerkrankungen und 522.000 Todesfälle durch Brustkrebs diagnostiziert [119]. Damit macht das Mammakarzinom der Frau sowohl in Deutschland als auch weltweit den größten Anteil aller neu diagnostizierter maligner Tumoren aus und stellt die häufigste Krebstodesursache der Frau dar [228, 254]. Das mittlere Erkrankungsalter für Frauen in Deutschland lag 2013 bei 64 Jahren, fast 30 % der betroffenen Frauen waren bei der Diagnosestellung jünger als 55 Jahre alt [228].

Die Inzidenzraten unterschieden sich 2012 weltweit um das Vierfache (Abb. 2) [120]. Während in Westeuropa und Nordamerika die altersstandardisierte Rate an Neuerkrankungen (pro 100.000 Einwohner) bei 96 bzw. 92 lag, war sie in Zentralafrika und Ostasien lediglich bei etwa 27 [272].

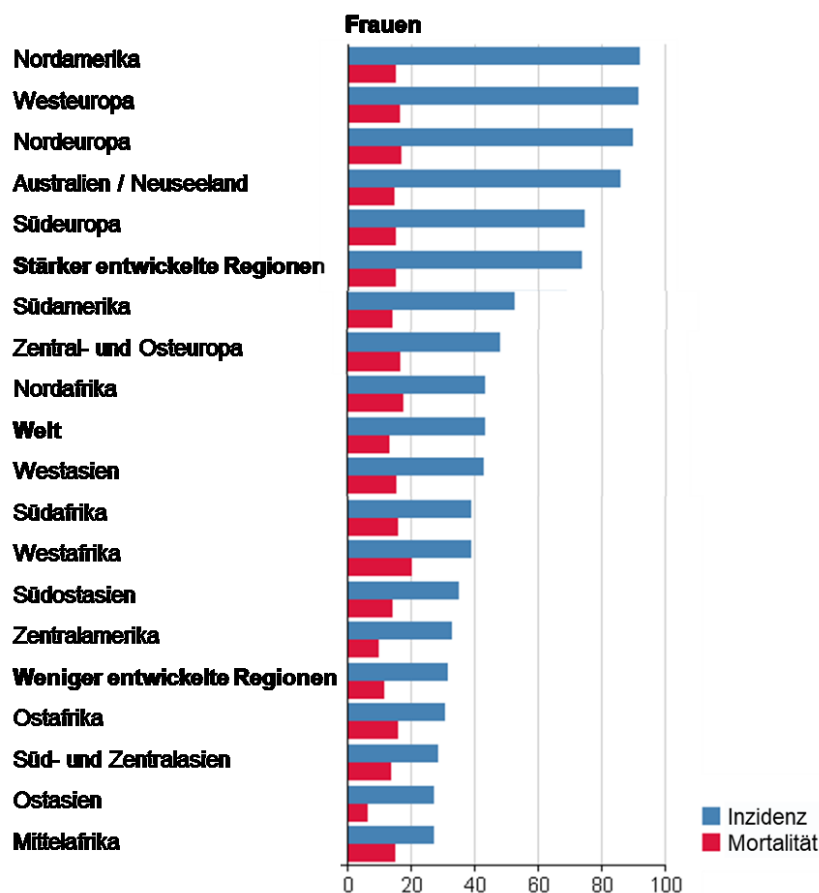


Abb. 2: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten von Brustkrebs 2012 im weltweiten Vergleich (je 100.000), modifiziert nach *International Agency for Research* 2015 [119].

1.2.2 ÄTIOLOGIE

Entartete Zellen entstehen durch Veränderung der genetischen Information, sog. Mutationen. Sind Onkogene (z. B. K-ras) oder Tumorsuppressorgene (z. B. p53) betroffen, führt deren Funktionseinschränkung zum Verlust von Regulations- und Kontrollmechanismen und damit zu einer Veränderung von Teilung, Wachstum und Differenzierung der Zellen [294]. Der Vererbung von einzelnen genetischen Defekten, wie der Keimbahnmutation des Tumorsuppressorgens BRCA bei familiärem Mammakarzinom, werden nur 5–10 % der Krebsfälle zugeschrieben [195]. In der Regel sind eine Reihe von Mutationen notwendig [110], die im Laufe des Lebens multifaktoriell durch endogene Faktoren wie beispielsweise Hormone, oxidativen Stress und chronischen Entzündungsprozessen sowie exogene Einflüsse wie z. B. Strahlung, Infektionen oder Ernährung entstehen [294]. Auch epigenetische Veränderungen spielen eine Rolle. Dabei kann es durch Methylierung oder Acetylierung von DNA- oder Histonabschnitten zu einer räumlichen Konfigurationsänderung der DNA und damit einer fehlerhaften Transkription von Genen kommen [294]. Schätzungsweise 70–90 % der Krebserkrankungen entstehen durch exogene Einflüsse [298].

Für die Mehrzahl der Brustkrebs-Patientinnen liegt keine genaue Ursache vor [138]. Neben der Vererbung von Genmutationen gibt es jedoch zahlreiche Risikofaktoren, die nachweislich die Entstehung von Brustkrebs beeinflussen können.

Wenn nicht anders erwähnt, beziehen sich die nachfolgend genannten Daten und Studien in dieser Arbeit auf Frauen.

1.2.2.1 RISIKOFAKTOREN

GENETISCHE UND FAMILIÄRE PRÄDISPOSITION

In etwa 30 % der Fälle ist eine Häufung von Brustkrebserkrankungen in der Familie von Betroffenen nachweisbar. Der Mutation eines bestimmten Risikogens werden aber nur in etwa 5–10 % der Brustkrebsfälle zugeschrieben [69]. Mit einem Anteil von etwa 25 % stellen insbesondere die autosomal-dominant vererbten Mutationen der Gene BRCA1 (breast cancer gene 1) und BRCA2 (breast cancer gene 2) einen wichtigen Risikofaktor des erblich bedingten Mammakarzinoms dar [137]. Laut einer Metaanalyse von 22 Studien haben Frauen mit einem BRCA1-Gendefekt bis zum Alter von 70 Jahren ein Risiko von 65 % (95 % Konfidenzintervall (KI): 44–78 %) an einem Mammakarzinom zu erkranken, bei BRCA2- Mutationsträgerinnen liegt das Risiko bei etwa 45 % (95 % KI: 31–56 %) [11]. Ein weiteres Risikogen für Brust- und Eierstockkrebs, das Tumorsuppressorgen RAD51C konnte 2010 vom Deutschen Konsortium für erblichen Brust und Eierstockkrebs identifiziert werden [176]. Es ist bei

ca. 1,5–4 % der Hochrisikofamilien mutiert [137]. Weitere Gene, die für erblichen Brustkrebs prädisponieren sind CHEK2 (checkpoint kinase 2) und ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated). 5–10 % der erblich bedingten Mammakarzinome entstehen im Rahmen seltener Syndrome, wie z. B. dem Li-Fraumeni-Syndrom im Rahmen einer Keimbahnmutation im TP53-Gen oder dem Cowden-Syndrom mit Mutationen im PTEN/MMAC-Gen. Die übrigen 40–45 % der erblich bedingten Mammakarzinome werden derzeit noch nicht identifizierten Mutationen zugeschrieben [137].

LEBENSALTER

Die Gefahr an Brustkrebs zu erkranken steigt mit zunehmendem Lebensalter. Ab dem gebärfähigen Alter nimmt die Inzidenz rasch zu, steigt auch nach der Menopause weiter an und erreicht mit 65 bis 70 Jahren ein Maximum. Im Anschluss sinkt das Risiko wieder etwas ab [228].

VORBELASTUNGEN DER BRUST

Neben Vorstufen eines Mammakarzinoms wie dem DCIS (*ductal carcinoma in situ*) und LCIS (*lobular carcinoma in situ*) [153] prädisponieren auch einige gutartige Veränderungen der Brust für ein invasives Karzinom. Von sog. Mastopathien, hormonell bedingten benignen Brusterkrankungen, die sich durch proliferative, involutive und fibrozystische Veränderungen auszeichnen [218], sind etwa 50 % aller Frauen zwischen dem 35. und 55. Lebensjahr betroffen [151]. Insbesondere proliferative Läsionen mit Atypien nach Page *et al.*, wie die atypische lobuläre oder duktale Hyperplasie, sind mit einer vier- bis fünfmal höheren Brustkrebswahrscheinlichkeit assoziiert [59, 74, 107, 160, 203].

Auch bei Frauen, deren Brustdrüsengewebe mammographisch eine hohe Dichte aufweist kann das Risiko um das Vier- bis Fünffache ansteigen [175].

Eine Strahlentherapie des Brustkorbs bei Malignomen im Kindes- oder Jugendalter ist ebenfalls ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Mammakarzinoms im Erwachsenenalter [111, 189, 216]. War eine Frau bereits an Brustkrebs erkrankt, ist die Gefahr auch an der kontralateralen Brust an einem zweiten primären Mammakarzinom zu erkranken gegenüber nicht vorbelasteten Frauen um das Zwei- bis Sechsfache erhöht [46].

REPRODUKTIVE UND HORMONELLE FAKTOREN

Menstruation, Schwangerschaft und Stillzeit

Ein langer hormonaktiver Zeitraum, also eine frühe Menarche und eine späte Menopause, erhöhen die Gefahr an Brustkrebs zu erkranken. Laut einer Metaanalyse der *Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer* 2012 von 117 Studien steigt das Risiko um den Faktor 1,050 (95 % KI: 1,044–1,057; $p < 0,0001$) pro Jahr bei verfrühter Menarche und um 1,029 (95 % KI: 1,025–1,032; $p < 0,0001$) für jedes Jahr älter bei der Menopause [57].

Ebenso erhöhen keine oder wenige Schwangerschaften und eine kurze Gesamtstillzeit die Gefährdung. Eine weitere Metaanalyse dieser Arbeitsgruppe im Jahr 2002 von 47 Studien zeigte, dass das Brustkrebsrisiko durch jede Geburt um 7,0 % (95 % KI: 5,0–9,0; $p < 0,0001$) und pro 12 Monate Stillzeit um 4,3 % (95 % KI: 2,9–5,8; $p < 0,0001$) gesenkt werden kann [56].

Orale Kontrazeption und Hormonelle Ersatztherapie

Eine Vielzahl an Studien belegen, dass die Einnahme einer postmenopausale Hormonerersatztherapie (HET) das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken signifikant erhöht [17, 21, 48, 54, 180]. Es steigt in Abhängigkeit von Zeitpunkt, Dauer der Einnahme und Hormonzusammensetzung bis auf mehr als das Zweifache an. Die größte Gefahr geht dabei von einer Östrogen-Gestagen-Kombinationstherapie und einer Einnahmedauer von mehr als 10 Jahren aus [17, 21, 180].

Über den Einfluss oraler Kontrazeptiva auf das Brustkrebsrisiko herrscht Uneinigkeit. Eine Vielzahl an Studien ergab, dass die Langzeiteinnahme oraler Kontrazeptiva zu keiner bzw. zu einer geringen signifikanten Erhöhung des Brustkrebsrisikos führt [49, 58, 71, 95, 104, 121, 171, 185, 281]. Einige Studien zeigen, dass sich das Risiko nach 5–10 Jahren nach Beendigung der Einnahme an das Risiko von Frauen, die nie ein orales Kontrazeptivum eingenommen haben, angleicht [49, 58, 121, 185].

LIFESTYLE FAKTOREN

Körpergröße und -Gewicht

Bei Übergewicht (*Body Mass Index* (BMI) 25–30) und vor allem Fettsucht (BMI > 30) in der Postmenopause ist die Gefahr an Brustkrebs zu erkranken um etwa 20–30 % erhöht [142, 278]. Nach einer Studie der *Women's Health Initiative* mit 67.142 postmenopausalen Frauen steigt das Risiko bei einem BMI > 30 um mehr als 50 % an [196]. Dabei zeigt sich eine starke Assoziation zu hormonrezeptorpositiven Tumoren [196, 257]. Prämenopausale übergewichtige (BMI 25–30) oder adipöse (BMI > 30) Frauen dagegen haben je nach Studie ein leichtes

signifikant [278] oder nicht-signifikant [142] geringeres Risiko als normalgewichtige Frauen an Brustkrebs zu erkranken.

Auch die Körpergröße scheint insbesondere in der Postmenopause für große Frauen einen signifikanten unabhängigen Gefährdungsfaktor für Brustkrebs darzustellen [142]. Van der Brandt *et al.* berichteten 2000 in einer Metaanalyse von einem relativen Risiko von 1,02 (95 % KI: 0,96–1,10) von prämenopausalen und 1,07 (95% KI: 1,03–1,12) von postmenopausalen Frauen pro Zunahme der Körpergröße um 5 cm [278].

Körperliche Aktivität

Laut einer Metaanalyse haben Frauen, die vermehrt körperlich aktiv sind ein um ca. 25 % geringeres Risiko an Brustkrebs zu erkranken als inaktive Frauen [164]. Insbesondere entspannte körperliche Aktivität mit mittlerer bis kräftiger Intensität führte in Studien zu einer Reduktion der Gefahr. Dies galt unabhängig von dem Menopausenstatus, war jedoch postmenopausal am größten und verstärkte sich bei lebenslanger Aktivität [85, 164].

Ernährung:

Zahlreiche Studien mit zum Teil stark abweichendem Design und Ergebnissen haben sich mit dem Zusammenhang von Brustkrebs und Ernährung beschäftigt. So gibt es Hinweise, dass eine „Westliche Diät“ reich an Zucker und Fett, Fleisch, Fertigprodukten und Alkohol mit einem erhöhten [38, 60], eine „Mediterrane Diät“ reich an Fisch, Früchten, Gemüse sowie Oliven- und Sonnenblumenöl hingegen mit einem geringeren [35, 38, 60, 276] Brustkrebsrisiko assoziiert ist. Einzeln betrachtet zeigte sich eine positive Assoziation mit einer erhöhten Aufnahme von gesättigten Fettsäuren [29, 247] sowie Fett insgesamt [29, 215], insbesondere für postmenopausale Frauen und ER-positive Karzinome [215, 246]. Für Gemüse- [15, 88] und Obstverzehr [15] allein sowie die Aufnahme von Vitamin A [87], C [88], D [134] und E [87] sowie Calcium [134] und Beta-Carotin [88] gibt es Hinweise auf eine mögliche protektive Wirkung. Auch zwischen Ballaststoff-Aufnahme und Brustkrebsrisiko zeigten sowohl eine Metaanalyse von Fall-Kontroll-Studien [115] als auch eine Metaanalyse von prospektiven Kohorten-Studien [14] eine leichte inverse Assoziation. Phytoestrogenen in der Nahrung wird ebenfalls eine Beeinflussung der Krebsentstehung zugeschrieben (siehe Kapitel 1.5).

Alkohol und Nikotin

Laut unterschiedlichen Metaanalysen steigt das Risiko an Brustkrebs zu erkranken mit je 10 g Alkohol pro Tag um etwa 7–10 % an [55, 129, 253] und liegt bei Mengen > 30 g pro Tag bei 30–45 % [55, 253].

Rauchen habe dagegen unabhängig vom Alkoholkonsum keinen oder allenfalls einen sehr geringen Einfluss [55]. Neuere Studien dagegen beschreiben ein erhöhte Gefährdung insbe-

sondere von Frauen, die vor ihrer Menarche und der ersten Geburt mit dem Rauchen begonnen haben [9, 90].

Stoffwechsel:

Eine Metaanalyse von 2007 zeigte, dass auch Diabetes mellitus Typ 2 mit einer statistisch signifikanten Risikoerhöhung für Brustkrebs von etwa 20 % gegenüber nicht erkrankten Frauen assoziiert ist [146]. Nach einer Metaanalyse und einem systematischen Review erhöht der Gesamtsymptomkomplex Metabolisches Syndrom die Gefahr an Brustkrebs zu erkranken insbesondere in der Postmenopause um fast 50 % [23, 81].

Nach Schätzungen der WHO wären weltweit etwa 30–50 % der Krebserkrankungen durch Reduktion von Risikofaktoren und Förderung eines gesunden Lebensstils vermeidbar [295].

1.2.3 KLASSIFIKATION

Die Stadieneinteilung des Mammakarzinoms erfolgt klinisch oder pathologisch nach dem TNM- bzw. UICC-System. Diese berücksichtigt neben der Größe des Tumors den Lymphknotenstatus und das Vorliegen von Fernmetastasen [68]. Sie wird durch Angaben über eine mögliche Multifokalität, mikroskopischen oder makroskopischen Tumorresten an den Resektionsrändern sowie einer peritumoralen Lymph- und Gefäßinvasion ergänzt [68].

Zusätzlich wird sowohl das vorzugsweise durch Stanz- oder Vakuumbiospie gewonnene Biopsie-Material als auch das Operationspräparat im Verlauf pathomorphologisch untersucht [68]. Histologisch werden invasive Karzinome und Vorläuferläsionen gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation von 2012 eingeteilt [143]. Die häufigsten Formen bösartiger invasiver Tumore der Brust sind epitheliale Ursprungs und umfassen mit einer Häufigkeit von 50–80 % das von den Milchgangepithelien ausgehende invasive duktales Karzinom vom nicht speziellen Typ (NST) und mit 5–15% das von den Drüsenläppchen ausgehende invasiv-lobuläre Mammakarzinom [68]. Seltene Formen sind unter anderem das medulläre (1–7 %), tubuläre (1–8 %), papilläre (1–7 %) oder das muzinöse (1–2 %) Mammakarzinom. Auch neuroendokrine Tumore, Lymphome und Sarkome kommen vor [19, 68].

Nach Feststellung des histologischen Typs erfolgt das histologische Grading in gut, mäßig und schlecht differenziert (G1–3) nach dem durch Elston und Ellis modifizierten Grading von Bloom und Richardson [68, 79]. Weiterhin werden im Rahmen der molekularen Untersuchung mittels Immunhistochemie und ggf. In-situ-Hybridisierung Östrogen-, Progesteron- und HER2/neu (human epidermal growth factor receptor 2, auch c-erb-B2) -Status sowie der Ki-67-Proliferationsindex des Tumors bestimmt [68]. 70–80 % der Karzinome exprimieren Steroidhormonrezeptoren, in 15 % der Fälle liegt bei einem Mammakarzinom eine Überex-

pression des Wachstumsfaktor-Rezeptors HER2/neu vor [68]. Anhand eines Genexpressionsprofils oder alternativ näherungsweise anhand der immunhistochemischen Ergebnisse erfolgt die Einteilung in die intrinsischen Subtypen – Luminal A, Luminal B, HER2-positiv und triple-negativ [68, 96].

Klassische TNM- und pathomorphologische Klassifikation, sowie zunehmend auf Multigen-tests beruhende Subtypen bilden eine wichtige Grundlage für das Therapiekonzept und die Prognose von Mammakarzinom-Patientinnen [67, 68].

1.2.4 THERAPIE

Die Therapie des Mammakarzinoms in Deutschland erfolgt patientenspezifisch in Brustkrebszentren. Sie ist nicht nur abhängig von Stadium und biologischem Befund, sondern auch von Alter, Begleiterkrankungen, körperlichem Zustand und Wunsch des Patienten. In einer interdisziplinären Tumorkonferenz wird anhand dieser Befunde ein individuelles Therapiekonzept aus Operation, medikamentöser Therapie und Strahlentherapie entwickelt. Hinzu kommen sowohl während der Therapie als auch in der Nachsorge eine psychoonkologische Betreuung und je nach Bedürfnis der Patientin supportive und komplementärmedizinische Verfahren.

OPERATIVE THERAPIE

Bei kurativem Ansatz ist die operative Entfernung des Tumors ein wichtiger Bestandteil des Therapiekonzeptes, die je nach Befund als brusterhaltende Therapie oder radikale Mastektomie mit verschiedenen Techniken und ggf. gleichzeitiger Rekonstruktion durchgeführt wird [68]. Zusätzlich wird dies ggf. durch eine Sentinel-Lymphonodektomie oder bei gegebener Indikation um eine Axilladisektion ergänzt [68].

MEDIKAMENTÖSE THERAPIE

Chemotherapie

Bei bestimmten Risikokonstellationen, wie beispielsweise jungem Erkrankungsalter (< 35 Jahre), HER2-positiven Tumoren, negativem Hormonrezeptorstatus, G3-Grading oder Nodal-positiven Tumoren kann die Indikation zur Chemotherapie gestellt werden. Zunehmend richten sich die Empfehlungen zur systemischen Therapie auch nach dem molekularen Subtyp [68, 96]. Hierbei werden sowohl adjuvant als auch neoadjuvant insbesondere Anthrazykline gefolgt von Taxanen verwendet. Bei triple-negativen Tumoren empfehlen die aktuellen Leitlinien auch Platinsalze [68]. Bei Patienten mit fortgeschrittenen metastasierten

Tumoren kommen weitere Chemotherapeutika ggf. in Kombination mit Bevacizumab, einem humanisierten monoklonalen Antikörper gegen den Endothelwachstumsfaktor VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*) [8], zur Anwendung [68]. Dieser kann das Tumoransprechen und das progressionsfreie Überleben verbessern [179, 181, 227], vor allem bei triple-negativen Tumoren [181].

Antikörpertherapie

Simultan zur Chemotherapie wird bei HER2/neu-Überexpression neoadjuvant oder adjuvant parallel zum Taxan ein Jahr lang eine Antikörpertherapie mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Trastuzumab, ggf. bei hohem Risiko ergänzt durch einen weiteren humanisierten monoklonalen Antikörper Pertuzumab, durchgeführt [68]. Zahlreiche Studien belegen ein deutlich erhöhtes Tumoransprechen auf Chemotherapie und rezidivfreies Überleben unter Trastuzumab bei HER2/neu-positiven Tumoren sowohl adjuvant in frühen Stadien [37, 208, 210, 232] als auch zusätzlich neoadjuvant bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen [92, 93]. Die neoadjuvante Gabe von Pertuzumab kann die pathologischen Vollremissions-Raten und das rezidivfreie Überleben weiter erhöhen [94], jedoch unter stärkeren Nebenwirkungen. Bei fortgeschrittenen metastasierten Tumoren verbessern sich unter Trastuzumab [172, 250] und Pertuzumab [18, 258] ebenfalls die progressionsfreie Zeit und das Gesamtüberleben.

Hormonelle Therapie

Bei positivem Hormonrezeptorstatus des Tumors gehört eine Hormontherapie zum Standard. Im Falle einer Chemotherapie-Indikation erfolgt diese im Anschluss [68]. Prämenopausal ist dabei die mindestens fünfjährige Einnahme des selektiven Estrogenrezeptor Modulators (SERM) Tamoxifen die Therapie der Wahl, während postmenopausal Aromatasehemmer wie Anastrozol für zwei bis fünf Jahre ggf. in Kombination mit einer vorrangegangenen oder anschließenden Tamoxifen-Therapie empfohlen werden [68].

STRAHLENTHERAPIE

Weiterhin kann adjuvant, primär bei Inoperabilität oder palliativ bei metastasiertem Karzinom eine Strahlentherapie der Brust und ggf. der Lymphknotenregionen erfolgen [68]. Nach einer Metaanalyse der *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* 2011 reduziert die Bestrahlung der betroffenen Brust nach brusterhaltender Therapie sowohl das 10-Jahres-Rezidivrisiko um insgesamt 15,7 %, als auch die Brustkrebsmortalität um 3,8 % [75]. Auch nach Mastektomie senkt die Bestrahlung das Risiko für ein Rezidiv und verbessert das Überleben [77]. Bei fortgeschrittenen metastasierten Tumoren kann durch Bestrahlung des

Tumors und der regionalen Lymphregionen eine Verlängerung des Überlebens erreicht werden [148].

WEITERE THERAPIEMAßNAHMEN

Im Rahmen einer Supportivtherapie werden durch die Erkrankung und Therapie auftretende Nebenwirkungen wie Übelkeit, Anämie, Infektionen oder Neurotoxizität vorgebeugt und behandelt [68]. Ergänzend kann bei Risiko für einen erhöhten Knochendichteverlust im Rahmen der Erkrankung und Therapie das sog. *bone targeted treatment* mit vorzugsweise Bisphosphonaten oder die Behandlung mit dem humanisierten monoklonalen RANK (*receptor-activator of nuclear factor kappa B*)-Liganden-Antikörper Denosumad erfolgen [68]. Auch eine Normalisierung des Körpergewichts, körperliche Aktivität sowie eine gesunde Ernährung, reich an Obst und Gemüse, Vollkorngetreide, Hülsenfrüchten und arm an gesättigten Fetten und Alkohol wird empfohlen. Rauchen sollte vermieden werden [68].

Laut einer Metaanalyse von insgesamt 152 Umfragen von 1998 bis 2009 aus Europa, USA, Kanada, Australien und Neuseeland verwendeten 40 % der Krebspatienten, mit steigender Tendenz, zum Zeitpunkt der Befragung zudem komplementäre oder alternative Medizin [113]. Brustkrebspatientinnen setzen noch deutlich häufiger unterstützend komplementärmedizinischen Verfahren ein [177, 187, 193]. Am häufigsten werden Vitamin- und Spurenelementsupplemente ergänzend zur Nahrung, sowie Massagen, Heilkräuter und Akupunktur verwendet [187, 193].

1.2.5 PROGNOSE

Die Prognose des Mammakarzinoms ist abhängig von den Tumorcharakteristika wie Tumorgroße, Nodal- und Fernmetastasenstatus (pTNM-Status), Resektionsrandstatus, histologischem Typ, Grading, Ki-67-, Hormonrezeptor- und HER2-Status. Auch nicht krebsassoziierte Faktoren wie Alter, Komorbiditäten und Nikotinabusus spielen eine wichtige Rolle [67, 68]. So haben Frauen mit pT1-Tumoren, N0- und M0-Status, G1-Grading, ER- und PR-positivem und HER2-negativem Tumor und einem Luminal A-Subtyp die beste Prognose [19].

Die individuelle Prognose der invasiven Mammakarzinome kann anhand des Nottingham-Prognose-Index abgeschätzt werden. Er umfasst die Tumorgroße, das Grading nach Elston und Ellis [79], sowie den Lymphknotenstatus, denen je nach Ausprägung ein Scorewert zugeteilt wird [68].

Insgesamt lag laut RKI die relative Überlebensrate für an Brustkrebs erkrankte in Deutschland im Jahr 2014 bei etwa 88 % in 5 Jahren und bei 82 % in 10 Jahren [228].

1.3 SEXUALHORMONE

Sexualhormone werden in drei Gruppen unterteilt – Estrogene, Gestagene und Androgene. Dabei handelt es sich um Steroidhormone, die aus Cholesterin synthetisiert werden und sowohl bei Frauen als auch bei Männern zahlreiche sexualspezifische und -unspezifische Wirkungen vermitteln. Hormonproduktionsorte sind neben den Gonaden auch die Nebennieren und die Plazenta. Zusätzlich werden im peripheren Fettgewebe Androgene durch Aromatisierung zu Estrogenen umgewandelt. Reguliert wird der Sexualhormonspiegel hauptsächlich über Gonadotropine als Teil der Hypothalamus-Hypophysen-Hormonachse.

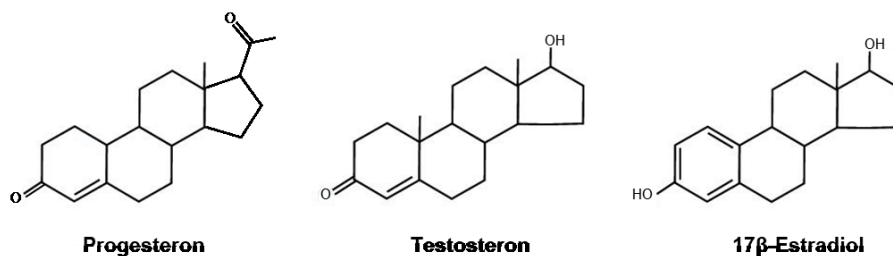


Abb. 3: Strukturformeln wichtiger Vertreter der Sexualhormone, modifiziert nach Birkenheuer [25, 26].

1.3.1 ESTROGENE

Die biologisch aktivste Form der natürlichen Estrogene ist das in dieser Arbeit verwendete 17β-Estradiol (Abb. 3), daneben kommen Estron und Estriol vor [8]. Etwa 69 % des Estradiols im Blut ist dabei an das sexhormonbindende Globulin (SHBG) und 30 % an Albumin gebunden, sodass ca. 1 % frei vorliegt und biologisch aktiv ist. Nach Inaktivierung über Glucuronidierung und Sulfatierung in der Leber werden die Estrogen-Metaboliten über Galle und Harn ausgeschieden [8].

Ihre klassische Wirkung entfalten Estrogene durch Bindung an die Hormonrezeptoren Estrogenrezeptor alpha (ERα) und Estrogenrezeptor beta (ERβ). Der ERα wird bei der Frau insbesondere in der Brust, Uterus, Thekazellen des Ovars, Knochen, Leber, weißem Fettgewebe und Gehirn exprimiert. Der ERβ dagegen ist insbesondere in Granulosazellen des Ovars, Darm, Knochenmark, Speicheldrüsen, Gefäßendothel und einigen Hirnregionen ausgebildet [63]. Es handelt sich dabei um intrazelluläre Rezeptoren, die eine ähnliche Domänenstruktur aufweisen (Abb. 4) [8].

1.3.1.1 DIE ESTROGENREZEPTOREN

Die N-terminale A/B-Domäne der beiden Rezeptoren ist hochvariabel und weist die Aktivierungsfunktion 1 (AF-1) für eine ligandenunabhängige Aktivierung auf (Abb. 4). Letztere spielt beim ER β funktionell eine untergeordnete Rolle. Angrenzend liegt die C-Domäne, die die DNA-Bindungsdomäne umfasst. Hier sind sog. Zink-Finger ausgebildet, die spezifisch an bestimmte DNA-Abschnitte, den Estrogen-responsiven Elementen (ERE) binden können. Das Kernlokalisierungssignal liegt in der D-Domäne, der sog. *hinge region* (Gelenkregion). Sie ist auch an der Assoziation zum HSP90 beteiligt. Die E/F-Domäne des C-terminalen Endes umfasst bei beiden Rezeptortypen unter anderem die hormonbindende Domäne mit der Aktivierungsfunktion 2 (AF-2) für die ligandenabhängige Aktivierung und damit den entscheidenden Bereich für die estrogenabhängige Transkription. Neben der Bindung von Agonisten und Antagonisten ist dieser Bereich auch an der Dimerisierung der Estrogenrezeptoren, der Bindung von Kofaktoren sowie an der Kernlokalisation beteiligt [209].

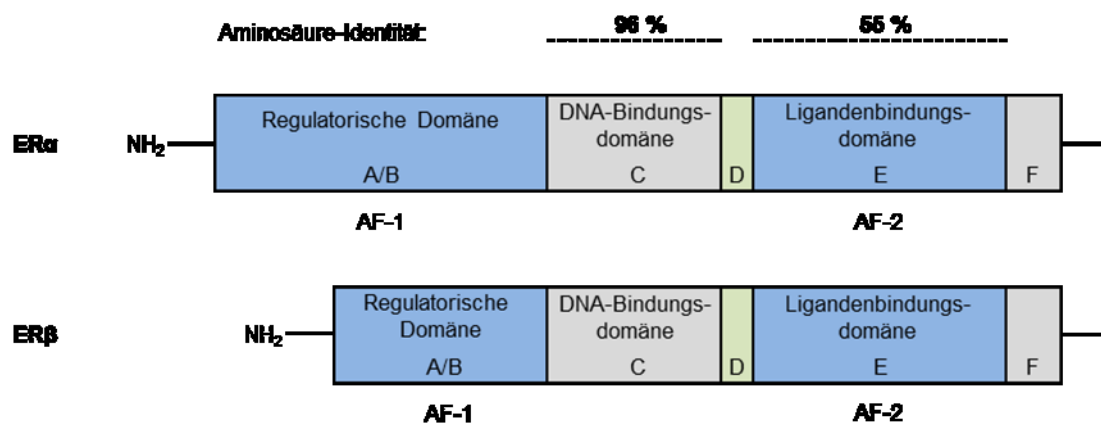


Abb. 4: Domänenstruktur der Estrogenrezeptoren im Vergleich, angelehnt an Leidenberger *et al.* 2014 [152] und Aktories 2017 [8].

1.3.1.2 WIRKUNG AM KLASSISCHEN ESTROGENREZEPTOR

Die Estrogenrezeptoren sind funktionell ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren, die im inaktiven Zustand an intrazelluläre Proteine gebunden, sog. Hitzeschockproteine, im Zytoplasma vorliegen. Bei Bindung von Estrogenen kommt es nach Transformation, Translokation und Dimerisierung des Hormon-Rezeptor-Komplexes zur Bindung an die ERE von Genen im Zellkern, gefolgt von einer Rekrutierung nukleärer Proteine, die die Transkription von Genen initiieren (Abb. 5a) [8]. Wenn in Zellen sowohl der ER α als auch der ER β exprimiert sind kann Letzterer funktionell die transkriptionelle Aktivität des ER α hemmen [39, 106, 173, 292].

1.3.1.3 ALTERNATIVE SIGNALWEGE

Weiterhin können ligangengebundene Estrogenrezeptoren Gene ohne ERE auch direkt über die Interaktion mit DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B regulieren (Abb. 5b) [198]. Neben der klassischen genomischen Wirkung der Estrogene werden auch rascher ablaufende Interaktionen mit membranären G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (z. B. GPER 1) [217], membrangebundenen Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (z. B. IGF-1R, EGFR, HER2/neu), weiteren spezifischen membrangebundenen zytosolischen Proteinkinasen (wie z. B. Src, ras und PI3-Kinase) [25] und auch direkte Interaktionen mit Ionenkanälen beschrieben (Abb. 5c–e) [140]. Auch epigenetische Mechanismen, beispielsweise durch Regulation der Histon-modifizierenden Enzyme SIRT 1 und HDAC6, sind eng mit dem Estrogen-Signalweg verknüpft [282].

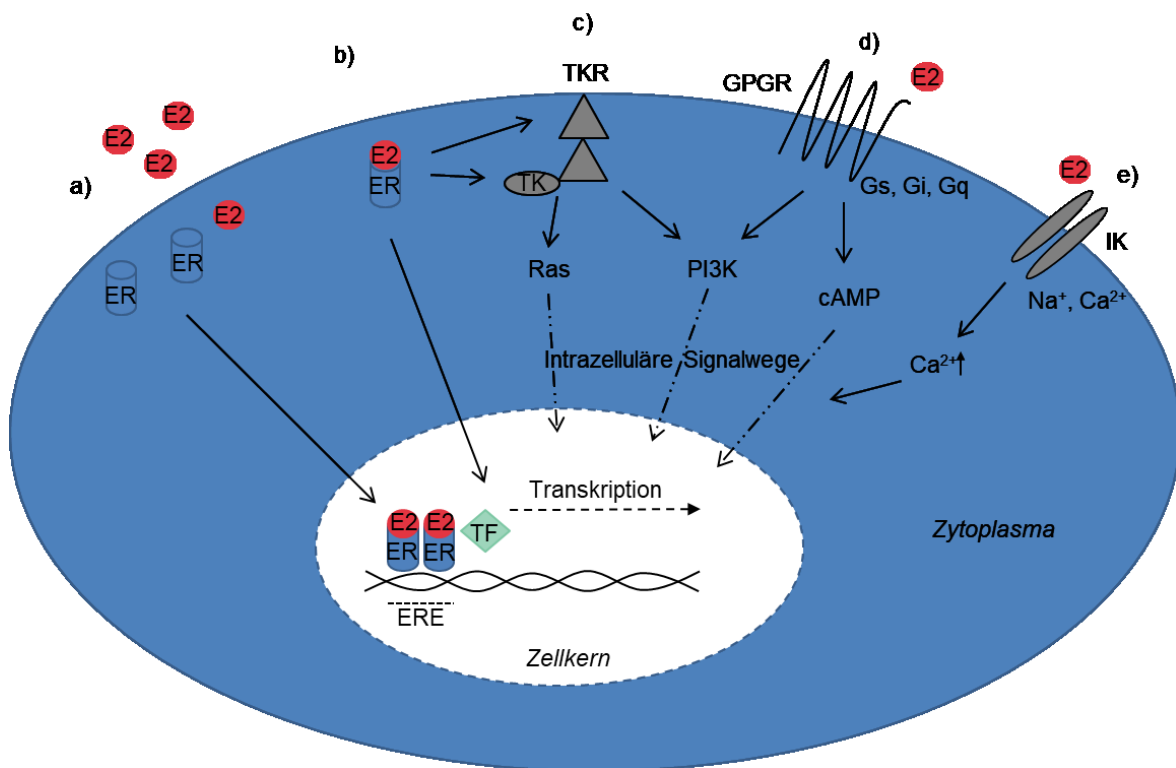


Abb. 5: Vereinfachte schematische Darstellung der Estrogen-vermittelten Signaltransduktion; a) ERE-abhängige klassische Estrogenwirkung; b) ERE-unabhängige direkte Interaktion mit Transkriptionsfaktoren (TF); c) Aktivierung von Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (TKR) wie den EGFR oder Proteinkinasen (PK) wie Src; d) Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPGR), z. B. Gs, Gi, Gq; e) direkte Aktivierung von Ionenkanälen (IK), z. B. Na⁺- und Ca²⁺- Kanäle; angelehnt an Aktories 2017 [8].

1.3.2 PROGESTERON

Progesteron ist das physiologische Gelbkörperhormon, das zusammen mit zahlreichen synthetischen Derivaten mit ähnlicher Wirkung zu der Gruppe der Gestagene gezählt wird (Abb. 3). Es wird im Corpus luteum der Plazenta und den Nebennieren gebildet [8]. Ähnlich wie bei den Estrogenen liegen nur etwa 2 % des Progesterons der Frau frei und aktiv vor. 80 % des Hormones sind an Albumin, 18 % an Transkortin und unter 1 % an SHBG gebunden. Progesteron wird durch Glucuronidierung und Sulfatierung in der Leber verstoffwechselt und die Abbauprodukte hauptsächlich über die Niere ausgeschieden [8].

Beim Progesteronrezeptor handelt es sich ebenfalls um einen intrazellulären Hormonrezeptor mit genomischem Wirkmechanismus. Anhand zwei unterschiedlicher estrogenabhängiger Promotoren werden aus einem Progesteronrezeptor (PR)-Gen zwei Rezeptor-Isoformen PR-A und PR-B exprimiert, die sich im N-terminalen Ende unterscheiden [91, 128]. PR-B ist vor allem für die Progesteronwirkung in der Brustdrüse, PR-A in Uterus und Ovarien verantwortlich [151]. Ebenso scheinen auch alternative Wirkungsmechanismen über G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Ionenkanäle eine Rolle zu spielen [289].

Die Wirkung von Gestagen ist von der Estrogenkonzentration und dem Estrogen-Gestagen-Verhältnis im Organ abhängig. Die Bildung von Progesteronrezeptoren wird beispielsweise durch Estrogen induziert und andersherum die Expression von Estrogenrezeptoren durch Progesteron gehemmt [151].

1.3.3 SEXUALHORMONE UND BRUSTKREBS

Sexualhormone spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs. Eine erhöhte Konzentration sowohl von Estrogenen als auch Androgenen in der Postmenopause ist signifikant mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert, SHBG dagegen zeigt eine negative Assoziation [127, 265]. Ein positiver, jedoch schwächerer Zusammenhang findet sich auch bei prämenopausalen Frauen [80].

Zum einen fördern sowohl endogene als auch exogene Estrogene Proliferation und Wachstum von Mammazellen, wodurch die Wahrscheinlichkeit für Replikations- und Reparationsfehler steigt [110]. Zum anderen zeigten sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* Metabolite des Estrogenstoffwechsels selbst genotoxisches Potenzial. Werden Estradiol oder Estron durch Hydroxylasen zu Katecholestrogenen (2- und 4-Hydroxyestrogene) hydroxyliert, können durch einen Redox-Zyklus Chinone und Semichinone entstehen. Als freie Radikale können Hydrochinone sowohl eine weitere Sauerstoff-Radikalbildung als auch selbst verschiedene DNA-Schäden auslösen [154]. Von der *International Association of Cancer Registries* wurden Estrogene im Rahmen einer HET oder in Kombination mit Gestagenen zur hormonellen

Kontrazeption der Risikogruppe 1 (*“Carcinogenic to humans”*) zugeordnet [118]. In einer Metaanalyse der *Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group* von 13 prospektiven Studien konnten bei zahlreichen Risikofaktoren für das Mammakarzinom wie beispielsweise Fettsucht, Alkoholkonsum oder Rauchen erhöhte Sexualhormonkonzentrationen festgestellt werden [130].

Auch Promotion und Progression der Karzinogenese des Mammakarzinoms können durch Estrogene beeinflusst werden. 70–80 % der Mammakarzinome exprimieren Steroidrezeptoren, über die z. B. Wachstum und Metastasierung von entarteten Zellen direkt gefördert werden können. Gleichzeitig wird dieser Umstand in der Klinik für die antihormonelle Therapie des Mammakarzinoms genutzt [68] und stellt einen wichtigen prognostischen Parameter dar [72].

1.4 SELEKTIVE ESTROGENREZEPTOR MODULATOREN

Selektive Estrogenrezeptor Modulatoren sind Stoffe, die abhängig von Gewebe- und Zellart eine estrogenagonistische oder -antagonistische Wirkung ausüben können [8]. SERMs binden kompetitiv um Estrogen an die klassischen Estrogenrezeptoren. Je nach SERM werden individuelle Konformationen des Estrogenrezeptors stabilisiert, die zu einer Interaktion mit unterschiedlichen koregulatorischen Proteinen führen. Abhängig von der Estrogenrezeptor-Expression im Gewebe kann es zu einer stark abweichenden biologischen Wirkung vom reinen Estrogen-Agonismus bis zu einem reinen Antagonismus kommen [225]. Auch hier werden zusätzliche schnelle, nicht über ERE vermittelte Wirkungen vermutet [28, 219, 307]. Klinisch relevante Vertreter dieser Gruppe sind beispielsweise Tamoxifen und Raloxifen (Abb. 6).

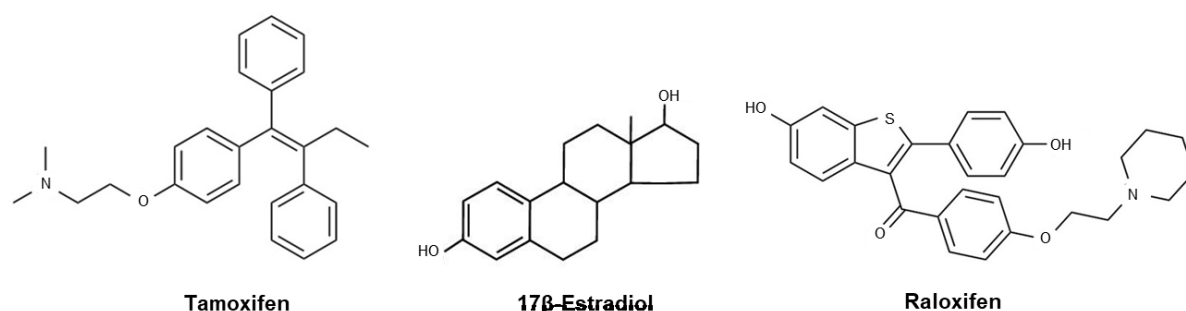


Abb. 6: Strukturformeln von 17β-Estradiol, Tamoxifen und Raloxifen im Vergleich, modifiziert nach Birkenheuer [26] und STEMCELL Technologies 2018 [256, 257].

1.4.1 TAMOXIFEN

Das in den Experimenten dieser Arbeit verwendete Tamoxifen ist ein nicht-steroidales Triphenylethylen-Derivat und gehört den SERMs der 1. Generation an. Es besitzt eine hundertfach niedrigere Affinität zu den Estrogenrezeptoren als Estradiol [8]. Tamoxifen übt seine agonistische Wirkung über die AF-1, die antagonistische Wirkung über die AF-2 der Estrogenrezeptoren aus. Überwiegt in einem Gewebe die AF-1 der ER α werden durch Tamoxifen daher estrogenähnliche Wirkung ausgelöst, während bei einer Dominanz der AF-2 im Gewebe antiestrogene Effekte ausgelöst werden können [103].

Im menschlichen Organismus wird Tamoxifen in der Leber zunächst hauptsächlich durch CYP3A4 und CYP3A5 zu N-Desmethyl-Tamoxifen verstoffwechselt. Im nächsten Schritt werden sowohl dieser Metabolit als auch Tamoxifen selbst insbesondere über CYP2D6 zu 4-Hydroxy-Tamoxifen und Endoxifen umgewandelt [31]. Nach Sulfatierung und Glucuronidierung werden sie nahezu vollständig über die Fäzes ausgeschieden [86].

Tamoxifen besitzt, vor allem als trans-Isomer, eine antiestrogene und damit antiproliferative Wirkung auf Brustkrebszellen [8], sodass es derzeit in allen Stadien zur Therapie von Estrogenrezeptor-positivem Brustkrebs eingesetzt wird [68]. In einer Metaanalyse aus dem Jahr 2011 von 20 Studien konnte gezeigt werden, dass unter der Einnahme von Tamoxifen die Rezidivrate ER-positiver Mammakarzinome in den ersten vier Jahren um fast 50 % und in den Jahren Fünf bis Neun um etwas mehr als 30 % verringert werden kann. Auch die Brustkrebs- und Gesamtmortalität wurden deutlich reduziert [76]. In weiteren Studien wurden bei der Langzeiteinnahme von Zehn Jahren gegenüber der fünfjährigen Einnahme von Tamoxifen zudem sowohl eine signifikante Reduktion der Rezidiv-Häufigkeit als auch der Brustkrebs- und Gesamtmortalität festgestellt [64, 97]. In 20–30 % der Fälle wird der Erfolg der antihormonellen Therapie jedoch durch eine bereits bestehende oder sich im Therapieverlauf entwickelnde Tamoxifen-Resistenz gemindert [194]. Auf ER-negative Mammakarzinome hat Tamoxifen laut *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* nahezu keinen Effekt [76]. Gleichzeitig wirkt Tamoxifen auf Endometriumzellen estrogenagonistisch und proliferationsfördernd. Eine gefürchtete Komplikation einer Tamoxifen-Therapie ist das Endometriumkarzinom, dessen Risiko bei der Einnahme von Tamoxifen insgesamt um das Zwei- bis Dreifache erhöht wird und insbesondere für Frauen über 50 Jahren ansteigt. Weiterhin zeigt sich unter der Tamoxifen-Therapie ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Ereignisse wie tiefe Beinvenenthrombosen, Lungenembolien und Schlaganfälle [61, 76]. Aufgrund dieser Risikokonstellation ist Tamoxifen in Deutschland nicht zur Prävention zugelassen.

1.5 PHYTOESTROGENE

Phytoestrogene sind „Pflanzeninhaltsstoffe mit östrogenähnlicher Wirkung“ [218] Sie gehören unter anderem zusammen mit Flavonoiden, Carotinoiden, Phytosterolen und Glucosinolaten zu den sekundären Pflanzenstoffen [66].

Chemisch betrachtet handelt es sich um Polyphenole, die anhand ihrer unterschiedlichen Struktur in drei große Klassen unterteilt werden können: Isoflavone, Lignane und Coumestane (Abb. 7). Wichtige Vertreter der Lignane sind beispielsweise Secoisolariciresinol und Matairesinol und der Isoflavone Genistein und Daidzein. Coumestrol ist der wichtigste Vertreter der Coumestane [192].

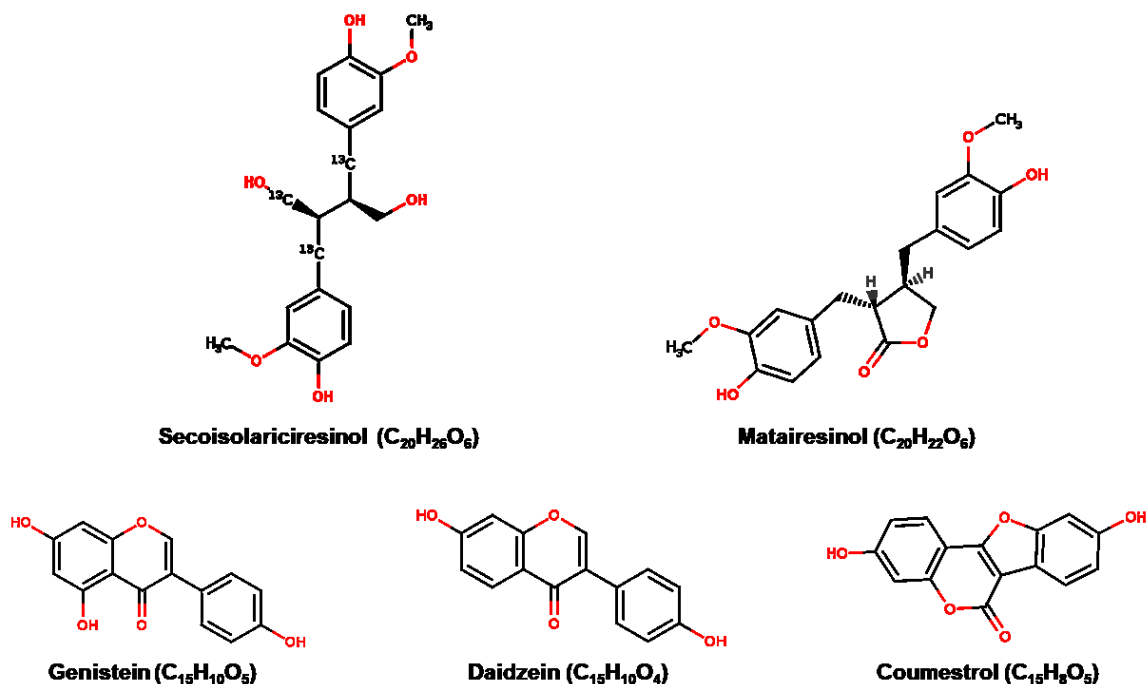


Abb. 7: Strukturformel unterschiedlicher Phytoestrogene im Vergleich nach Phenol-Explorer 2015 [208].

Neben positiven Auswirkungen auf klimakterische Beschwerden, postmenopausale Osteoporose, kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen sowie auf das Immunsystem [249] werden Phytoestrogenen in der Nahrung, insbesondere den Isoflavonen, ein Einfluss auf hormonrezeptorpositive Karzinome wie dem Mamma- [43, 245, 297] oder Prostatakarzinom [301] zugeschrieben.

WIRKUNGSMECHANISMUS

Die phenolische Grundstruktur von Phytoestrogenen ähnelt der chemischen Struktur der steroidalen Estrogene. Durch sterische Eigenschaften sind sie in der Lage kompetitiv zu Estrogen mit den LBD der Estrogenrezeptoren zu interagieren. Hierbei spielt die Anordnung der Hydroxylgruppen, die mit den Rezeptorproteinen in Wechselwirkung treten, eine entscheidende Rolle [156]. Die Bindungsaffinität am Estrogenrezeptor variiert je nach Phytoestrogen um mehr als das 1000-fache, ist aber stets geringer als die des Estradiols. Die Affinität zum ER β der meisten Phytoestrogene ist um ein Vielfaches höher als zum ER α . Auch ihre Wirkpotenz ist an beiden Rezeptoren deutlich schwächer ausgeprägt als die des natürlichen Estrogens, was möglicherweise mit einer geringeren Interaktion der phytoestrogenengebundenen Rezeptoren an den EREs im Zellkern mit Kofaktoren zusammenhängt [191]. Wie auch bei Tamoxifen können durch Phytoestrogene je nach Konzentration, endogenem Estrogenspiegel sowie Verhältnis der beiden Estrogenrezeptoren im Gewebe, estrogenartige oder antiestrogene Wirkungen entstehen. Phytoestrogene wirken daher als eine Art natürlicher SERM.

PHYTOESTROGENE IN LEBENSMITTELN

Den größten Anteil an Phytoestrogenen in unserer Nahrung machen Isoflavone und Lignane aus. Isoflavone finden sich insbesondere in Sojabohnen und dessen Erzeugnissen, Lignane vor allem in Lein- und Sesamsamen. Auch in Getreide, Brot, Nüssen, einigen Frucht- und Gemüsesorten, tierischen Erzeugnissen, sowie in alkoholischen und nicht-alkoholischen Getränken wie z. B. Säften und Rotwein sind Phytoestrogene enthalten [269].

Studien mit japanischen und chinesischen Frauen zeigten, dass Frauen im asiatischen Raum durchschnittlich allein 40–46 mg Isoflavone am Tag zu sich nehmen [47, 122]. In Nordamerika und Europa dagegen ist der durchschnittliche tägliche Phytoestrogen-Konsum mit insgesamt zwischen weniger als 1 mg und 3,8 mg pro Tag deutlich geringer. Im Gegensatz zur Ernährungsweise in Asien, die hauptsächlich Isoflavone aus Soja als Phytoestrogenquelle enthält, machen im westlichen Kulturkreis Lignane den größten Anteil in der Ernährung aus [26, 136, 302].

1.5.1 LIGNANE

Die in dieser Arbeit verwendeten Teststoffe gehören den Lignan an. Herman Adlercreutz von der Universität Helsinki beschäftigte sich als Vorreiter seit 1980 mehr als drei Jahrzehnte lang intensiv mit Lignan und deren Bedeutung im Zusammenhang mit Krebserkrankungen. Lignane sind dimere Phenylpropanoide (C_6C_3 -Körper), die über das mittlere Kohlenstoffatom (β -C-Atom) der C_3 -Seitenketten miteinander verbunden sind [105]. Sie liegen in den Pflanzen meist als Glykoside oder Diglycoside vor [4]. Pflanzliche Vertreter, die im menschlichen Stoffwechsel eine Rolle spielen, sind z. B. Secoisolariciresinol (SECO) und Matairesinol (MATA), 7-Hydroxymatairesinol, Medioresinol, Lariciresinol, Pinoresinol, Syringaresinol, Arcigenin und Sesamin [109, 207].

1.5.1.1 LIGNANE IN NAHRUNGSMITTELN

Verschiedene Studien haben den Lignangehalt in Nahrungsmitteln untersucht (Tab. 1). Die teilweise stark abweichenden Mengen werden auf genetische und umweltbedingte Variationen der Pflanzen, Saison, Zubereitung der Proben, Aufbewahrung, Trocken- und Extraktionsmethoden sowie auf die Messmethode zurückgeführt [178, 251, 252, 269].

Tab. 1: Lignangehalt in ausgewählten Nahrungsmitteln (μg / 100 g Feuchtgewicht, *ohne Sesamin) nach Milder *et al.* 2005 [178] und Thompson *et al.* 2006 [269]

Nahrungsmittel	Secoisolariciresinol [$\mu\text{g}/100\text{g}$]	Matairesinol [$\mu\text{g}/100\text{g}$]	Lignane Gesamt [$\mu\text{g}/100\text{g}$]
Leinsamen	294210–375321,9	153,3–553	301129–379012,3
Sesamsamen	7,3–66	123,1–481	7997,2*–39348
Mehrkornbrot	4770,4–6163	1,2–19	4785,6–6744
Hummus	2,5	15,5	979,4
Knoblauch	42,0–50	0–4,8	536–583,2
Schwarzes Lakritz	341,5	1,3	415,1
Getrocknete Aprikosen	147,6	0,6	400,5
Sojabohnen	79,1	1,8	269,2
Sonnenblumenkerne	26,2–53	0–0,5	210,3–891
Roggenbrot	13–122,0	0,2–14	142,9–320
Mandeln	70,3	0,3	111,7
Cashewnüsse	37,5–133	0–0,3	99,4–629
Brokkoli	5,8–38	0–0,1	93,9–1325
Haselnüsse	60,5	1,2	77,1
Grüne Bohnen	30,9	0,6	66,8
Pfirsiche	13,6–27	0–1,6	61,8–293
Rotwein	29,4–61	0–7,8	37,3–91
Kaffee	4,7–9	0–0,1	5,9–19

Secoisolariciresinol machte in 63 der 121 von Thompson *et al.* 2006 getesteten Nahrungsmittel den größten Anteil der in dieser Studie bestimmten Lignane aus, Matairesinol bis auf wenige Ausnahmen den geringsten. Bei 44 der Nahrungsmittel dagegen wurde größtenteils Lariciresinol und bei 14 Pinoresinol nachgewiesen [269].

Der höchste Lignangehalt (> 300 mg / 100 g) findet sich in Leinsamen [178, 251, 252, 269], insbesondere in deren äußeren Hülle [252]. Da der Gemeine Lein (*Linum usitatissimum*) in unseren Breitengraden heimisch und gut kultivierbar ist, stellt er theoretisch ein Pendant zur Sojapflanze in Asien dar [70].

1.5.1.2 METABOLISIERUNG DER LIGNANE

In Säugetieren werden die pflanzlichen Lignane durch die bakterielle Mikroflora im Kolon hauptsächlich zu den sog. Säuger-Lignanen bzw. Enterolignanen Enterodiol (END) und Enterolacton (ENL) umgesetzt [27, 109]. Bei diesem Vorgang spielen zahlreiche Bakterienstämme, beispielsweise aus der Gattung der Clostridien, Bacterioides, Eubacterium, Peptostreptococcus und Eggerthella, eine Rolle [52]. Die bakterielle Verstoffwechselung im Darm spielt eine zentrale Rolle für das Ausmaß in dem die pflanzlichen Lignane zu Enterolignanen umgesetzt werden.

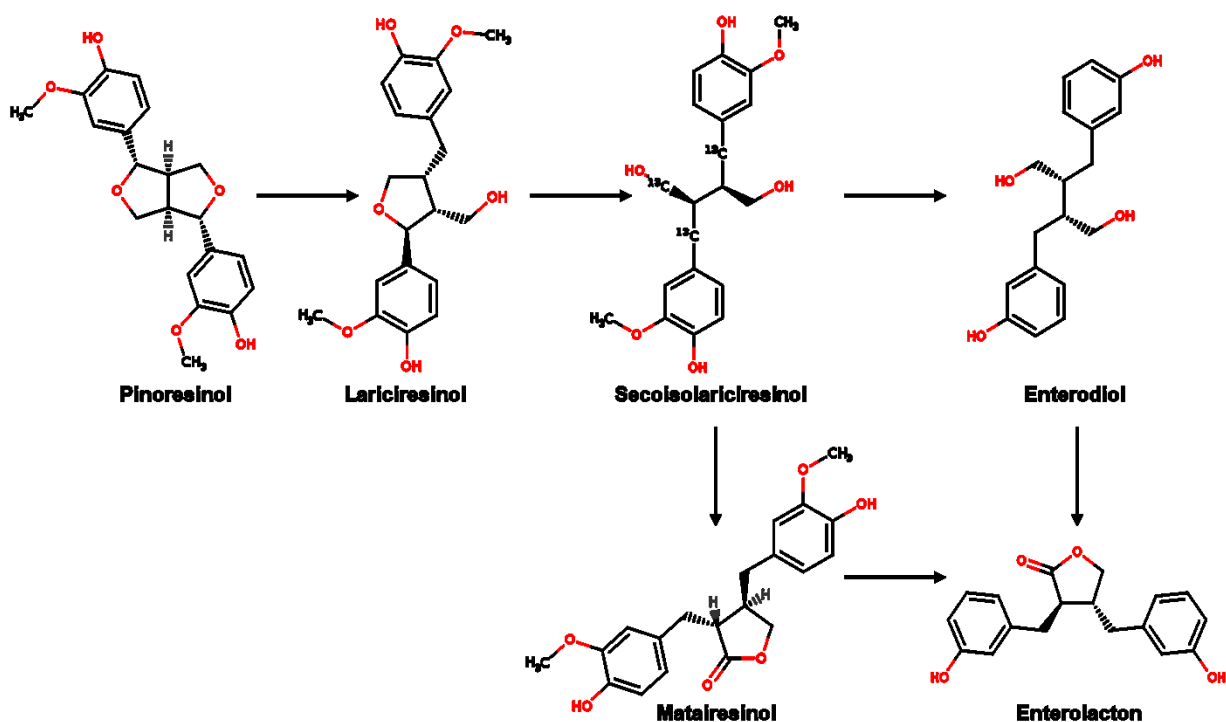


Abb. 8: Metabolisierung ausgewählter Lignane, angelehnt an Heinonen *et al.* 2001 [108].

Neben der generellen interindividuellen Variation der Mikroflora wird durch weitere Faktoren wie Art und Zubereitung der Nahrungsmittel, Darmpassage, Medikamenteneinnahme, Lebensstil und körperliche Merkmale die Plasmakonzentration der Enterolignane erheblich beeinflusst [4]. So kann sich eine Antibiotikaeinnahme, wahrscheinlich durch Einfluss auf die Mikroflora, noch über ein Jahr lang negativ auf die Enterolignan-Konzentration im Körper auswirken [131, 241]. Auch Fettleibigkeit und Rauchen sind negativ, Obstipation hingegen positiv mit der Enterolacton-Plasmakonzentration assoziiert [132].

Das in dieser Arbeit eingesetzte pflanzliche Secoisolariciresinol-Diglykosid (SDG) wird nach Hydrolyse zum Aglykon Secoisolariciresinol über eine Dehydroxylierung und Demethylierung zu Enterodiol umgesetzt. Enterodiol wird wiederum zu Enterolacton oxidiert. Matairesinol wird über eine Demethylierung und Dehydroxylierung direkt zu Enterolacton verstoffwechselt (Abb. 8) [109, 145]. Im Anschluss an die Resorption unterliegen Lignane, wie auch Steroidhormone, einem enterohepatischen Kreislauf. Nach Glucuronidierung und Sulfatierung in der Leber werden sie über Urin und Galle ausgeschieden und teilweise im Darm erneut dekonjugiert und resorbiert [16, 263].

1.5.1.3 WIRKUNG AM KLASSISCHEN ESTROGENREZEPTOR

Die Säuger-Lignane haben eine höhere physiologische Aktivität als deren pflanzliche Vorstufen. *In-vitro*-Studien an verschiedenen Zellarten zeigen, dass Enterolacton dennoch nur weniger als 1/1.000 der Bindungsaffinität zum Estrogenrezeptor von 17 β -Estradiol besitzt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Phytoestrogenen wie z. B. Genistein oder Coumesterol ist die Bindungsaffinität von Enterolacton zum ER α stärker als zum ER β [191]. Auch die Potenz (*potency*) die Estrogen-Rezeptoren zu aktivieren und die maximale Wirkstärke (*efficacy*) ist bei Enterolacton und Enterodiol im Vergleich zu Estradiol nur schwach ausgeprägt [191, 288]. Bei gleichzeitiger Gabe mit 17 β -Estradiol kann Enterolacton dessen Aktivität um 20–40 % reduzieren. Es wird daher als partieller Agonist / Antagonist bezeichnet [191].

1.5.1.4 ERE-UNABHÄNGIGE WIRKUNGSMECHANISMEN

Neben der direkten rezeptorvermittelten Wirkung werden Phytoestrogenen auch Auswirkungen auf die Sexualhormonspiegel, Signalwege der Zelle, Zellzyklus, Zelltod, Epigenetik und Angiogenese zugeschrieben [24].

Über die Inhibition der Aromatase [5, 32] und der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase [32] können Enterodiol und Enterolacton *in-vitro* die Estrogensynthese hemmen. Durch eine Hemmung der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und der 5 α -Reduktase wird auch die Testosteronsynthese sowie die Konversion zu dessen biologisch aktiver Form

5 α -Dihydrotestosteron *in-vitro* reduziert [82]. Zudem sind hohe Enterodiol- und Enterolactonkonzentrationen in Plasma und Urin positiv mit der SHBG-Konzentration assoziiert [3, 6, 304], wodurch mehr aktive Sexualhormone gebunden werden können.

Weiterhin wurde in einer Studie von Xiong *et al.* aus dem Jahr 2015 nachgewiesen, dass Enterolacton *in-vitro* in ER-negativen Zellen zu einer verminderten Expression von Zellzyklus-Regulatoren wie Cyclin E1 und A2 und einer geringeren Aktivierung des FAK / paxillin-Signalwegs führt, der mit der Invasion und Migration von Zellen assoziiert ist [300]. Auch auf den Signalweg ERK / NK- κ B / Snail hat Enterolacton *in-vitro* einen modulierenden Einfluss, wodurch über Inhibition von TGF- β potenziell eine Metastasierung verhindert werden könnte [166]. Die verringerte Expression von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) durch Enterolacton in Estrogenrezeptor-positiven und -negativen Zellen *in-vitro* kann möglicherweise ebenfalls Invasion und Metastasierung von Mammakarzinomzellen beeinflussen [167].

Darüber hinaus konnten *in-vivo* unter Lignanexposition eine Abnahme des Plasmaspiegels des Wachstumshormons IGF-1 [224] und sowohl bei ER-positiven [22, 234], als auch -negativen Mammatumoren [41] eine Reduktion des Wachstumsfaktors VEGF sowie des Zellproliferations-Markers Ki-67 nachgewiesen werden. Bei Hormonrezeptor-negativen Karzinomen wurde in Studien zusätzlich eine Abnahme von IGF-1 und EGFR festgestellt [41, 62]. Auch in einer klinischen Studie zeigte sich bei Supplementierung von Secoisolariciresinol-Diglykosid über 12 Monate eine leichte, signifikante Reduktion von Ki-67 [83]. In verschiedenen Studien zeigten Secoisolariciresinol und vor allem Enterolacton und Enterodiol zudem moderate antioxidative Wirkungen *in-vitro* [135, 214].

1.5.1.5 LIGNANE UND BRUSTKREBS

Adlercreutz *et al.* vermuten, dass ein Anteil an der geringen Brustkrebsinzident in Ostasien im Vergleich zum westlichen Durchschnitt auf die phytoestrogenreiche Ernährung in diesem Raum zurückzuführen ist [2, 4]. Der deutliche Anstieg der Brustkrebsinzidenz in den vergangenen Jahrzehnten, beispielsweise in Japan oder China [254], wird unter anderem einer Veränderung der Traditionen, insbesondere der Anpassung von reproduktiven Faktoren, Lebensstil und Ernährungsgewohnheiten an die westlichen Länder in Verbindung gebracht [65, 124, 212, 244]. Erkenntnisse aus Migrationsstudien bekräftigen diesen Zusammenhang. 1993 zeigte eine Studie, dass das Brustkrebsrisiko von Frauen, die aus China, Japan oder den Philippinen in die USA ausgewandert waren, über Generationen anstieg und sich schließlich an das durchschnittliche Risiko amerikanischer Frauen annäherte [308]. Eine weitere Studie, die Brust- und Prostatainzidenz von Einwanderern aus verschiedenen ethnischen Gruppen in die USA mit der Inzidenz aus deren Heimatland verglich, erzielte ähnliche Ergebnisse. So war die Brustkrebsinzidenz von japanischen Migranten im Vergleich zu der in

ihrem Heimatland deutlich höher, insbesondere bei Frauen die schon in frühen Lebensjahren einwanderten [243]. Die genetische Veranlagung überzeugte als einzige Ursache für diesen Zusammenhang nicht. Lebensstil und Ernährung rücken zunehmend in den Fokus. Welche Rolle Phytoestrogene dabei spielen ist Schwerpunkt vieler Forschungsgruppen. Lignane, als Hauptvertreter der Phytoestrogene in der westlichen Ernährung, sind dabei Gegenstand dieser Arbeit.

Nach dem Nachweis von zum Teil antiproliferativer [190, 284] und antioxidativer [135, 214] Einflüsse von Lignan auf Mammakarzinomzellen *in-vitro* bekräftigten auch *in-vivo*- Untersuchungen die Ergebnisse. Versuche mit ovariectomierten Mäusen zeigten, dass eine Injektion von END und ENL [22, 213] oder eine Diät mit 10 % Leinsamen [22, 40, 234] zur Rückbildung von humanen MCF-7-Tumoren (ER-positiv) führte. Auch ein Rückgang von Zellinvasion und Angiogenese konnte beobachtet werden [233]. Zudem zeigten Studien, dass eine Diät mit 10 % Leinsamen [41, 62, 285] und die Supplementierung mit SDG [285] in Mäusen sowohl Wachstum als auch Metastasierung auch von ER-negativen humanen MDA-MB-435-Tumoren deutlich hemmt. Einige humane Studien zeigten ebenfalls eine unterschiedlich stark ausgeprägte signifikante Assoziation zwischen erhöhten Enterolacton-Plasmakonzentrationen [141, 200, 240] bzw. lignanreicher Ernährung [33, 174] und einer verringerten Brustkrebs-Mortalität sowie teilweise Gesamt-Mortalität und krankheitsfreiem Überleben. Buck *et al.* untersuchten 2010 in einer Metaanalyse aus 11 prospektiven Kohorten-Studien und 10 Fall-Kontroll-Studien den Zusammenhang zwischen der Aufnahme pflanzlicher Lignane, Aufnahme von Enterolignan sowie der Enterolacton-Konzentration in Blut und Urin mit dem Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Insgesamt ergab die gepoolte Analyse, bei signifikanter Heterogenität der Studien, keine signifikante Senkung des Brustkrebsrisikos bei Vergleich der höchsten mit der niedrigsten Lignan-Exposition, sowohl kalkuliert über die Lignanaufnahme als auch anhand der Biomarker in Blut und Urin (RR: 0,92; 95 % KI: 0,81–1,02). Bei Differenzierung zwischen prä- und postmenopausal konnte lediglich bei postmenopausalen Frauen eine negative Assoziation festgestellt werden (RR: 0,86; 95 % KI: 0,78–0,94) [34].

Zusammenfassend lässt die aktuelle Studienlage aufgrund nicht-eindeutiger Ergebnisse keine Rückschlüsse und Empfehlungen in Bezug auf das Mammakarzinom zu. Um Patienten zu identifizieren, die von einer präventiven oder therapeutischen Lignan-Substitution profitieren könnten muss die Wirkung auf unterschiedliche Zellen und deren Wirkmechanismus weiter aufgeschlüsselt werden.

II. ZIELSETZUNG

Das Mammakarzinom ist der häufigste maligne Tumor und die häufigste Krebstodesursache der Frau weltweit. Lebensstil und Ernährungsgewohnheiten sind aufgrund der erheblichen geographischen Unterschiede in der Brustkrebsinzidenz Gegenstand zahlreicher Forschungsgruppen. Vor allem der phytoestrogenreichen Sojapflanze im asiatischen Raum wird eine entscheidende Rolle der vergleichsweise geringen Brustkrebshäufigkeit in diesem Raum beigemessen. So werden zunehmend auch die Leinpflanze und darin enthaltene Lignane, die den größten Anteil der Phytoestrogene in der Nahrung in westlichen Kulturkreisen ausmachen, hinsichtlich einer möglichen antitumorigenen Wirkung untersucht. Das Ziel der Arbeit war es, die potenzielle tumorpräventive bzw. -therapeutische Wirkung isolierter Lignane auf unterschiedlich veränderte Zellen der Mamma zu beurteilen. Hierzu wurde der Einfluss der vier kommerziellen Lignane Secoisolariciresinol, Matairesinol, Enterolacton und Enterodiol auf die benigne fibrozystisch veränderte Mammazelllinie MCF-12A, eine unveränderte epitheliale Primärkultur der Mamma (HMEC) sowie die maligne entartete sarkomatöse Mammakarzinom-Zelllinie Hs 578T *in-vitro* untersucht. Die Wirkung der Lignane auf Zytotoxizität, Zellproliferation und Zellmetabolismus der verschiedenen Zellen ermittelten wir mittels LDH- und BrdU-Test sowie der Bestimmung des oxidativen Stresses, des Glukoseverbrauches und des pH-Wertes. Die Ergebnisse wurden untereinander sowie mit der Wirkung der Kontrollsubstanzen 17 β -Estradiol und des synthetischen SERMs Tamoxifen verglichen.

Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

- Welchen Einfluss haben kommerzielle Lignane auf Proliferation und Vitalität? Zeigen die Lignane eine konzentrationsabhängige Wirkung?
- Welche Wirkung üben die genutzten Lignane auf benigne und maligne Mammatumorzellen aus? Zeigen sich Unterschiede zwischen den Tumorzellen und den normalen Mammaepithelzellen (HMEC)?
- Inwieweit spielt der Rezeptorstatus eine Rolle?
- Wie wirken sich die Lignane im Vergleich zum natürlichen Estrogen 17 β -Estradiol und zum SERM Tamoxifen auf die oben genannten Parameter aus?
- Sind Lignane potenzielle Kandidaten für einen präventiven oder therapeutischen Einsatz im Zusammenhang mit dem Mammakarzinom?

III. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

Eine detaillierte Auflistung der einzelnen Materialien – Zelllinien, Test- und Kontrollsubstanzen, Chemikalien, Puffer und Lösungen, Test-Kits, Antikörper, Verbrauchsmaterialien sowie Geräte und Software – befindet sich in tabellarischer Form im Anhang (siehe Kapitel X, Tab. 3–11).

3.1.1 ZELLINIEN

Die Wirkung der vier kommerziellen Lignane wird in dieser Arbeit an drei unterschiedlich veränderten humanen Mamma-Epithelzelllinien – MCF-12A, Human Mammary Epithelial Cells (HMEC) und Hs 578T – untersucht.

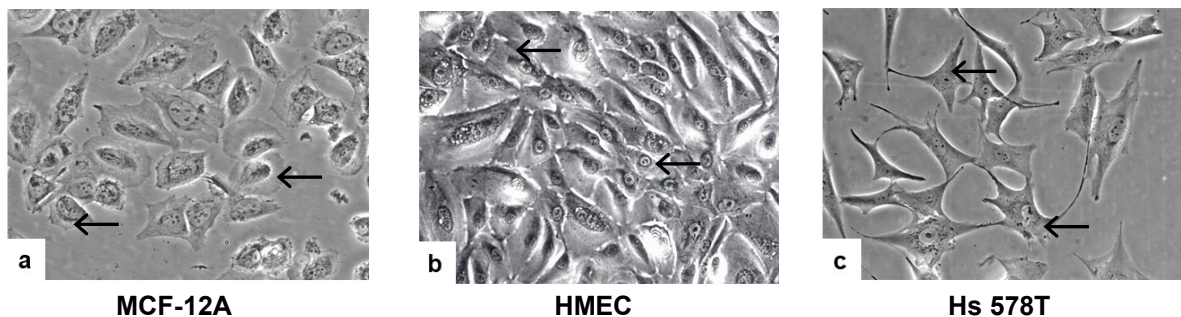


Abb. 9: Lichtmikroskopische Aufnahme der Zelllinien (Vergrößerung 20 x); a) Zelllinie MCF-12A; b) HMEC; c) Zelllinie Hs 578T. Jeweilige Zellen exemplarisch mit schwarzem Pfeil markiert.

MCF-12A:

Die benigne veränderte Zelllinie MCF-12A entstammt fibrozystisch erkranktem Brustdrüsengewebe einer 60-jährigen postmenopausalen kaukasischen Frau, welche an der kontralateralen Brust an einem invasiv-duktalem Mammakarzinom erkrankt war. Die Zellen wurden erstmals im Jahr 1992 von Paine *et al.* charakterisiert und durch Langzeitkultivierung immortalisiert [204]. Es handelt sich um eine adhärent wachsende Zelllinie mit einer Populations-Verdopplungszeit von etwa 19 Stunden [204]. Die Zellen haben eine rundliche Morphologie und exprimieren sowohl Estrogen- als auch Progesteronrezeptoren.

In dieser Arbeit wurden die Passagen 26 bis 40 verwendet (Abb. 9a).

HMEC:

An zweiter Stelle dient die Primärkultur der HMEC der 5. Passage als Vergleich (Abb. 9b). Dabei handelt sich um unveränderte humane Mamma-Epithelzellen, die aus dem Brustgewebe einer erwachsenen Frau gewonnen wurden. Die Zellen bilden eine kubische Morphologie mit charakteristischem Wirbelmuster der Zellen aus und exprimieren sowohl Estrogen- als auch Progesteronrezeptoren. Sie wachsen wie die anderen Zelllinien adhärent und haben üblicherweise eine Populations-Verdopplungszeit von 24 bis 30 Stunden [267].

Hs 578T:

Die maligne Zelllinie Hs 578T wurde aus einem sarkomatösen Mammakarzinom einer 74-jährigen postmenopausalen kaukasischen Frau entnommen und 1977 von Hackett *et al.* charakterisiert [100]. Die Zellen wachsen ebenfalls adhärent und zeigen eine Verdopplungszeit der Population von 34 Stunden [117]. Im Gegensatz zu MCF-12A zeigt diese Zelllinie eine sternförmige Morphologie und zeichnet sich laut Zellbank der *American Type Culture Collection* (ATCC) durch das Fehlen von Steroidrezeptoren aus [13].

In dieser Arbeit wurden die Passagen 10 bis 21 verwendet (Abb. 9c).

3.1.2 ZELLKULTURMEDIENTEN UND ZUSÄTZE

MCF-12A

Für die Zelllinie MCF-12A wurde 500 ml des Mediums *Hams Nutrient Mixtures* (Ham's) F-12 mit L-Glutamin, 25 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) und 1,176 g/l NaHCO₃ (Natriumhydrogencarbonat) von *PAN Biotech* verwendet und mit 10 % Pferdeserum, 2 % *Mammary Epithelial Cell Supplement*, sowie mit 0,2 % Penicillin / Streptomycin und 0,5 % Amphotericin B versetzt.

Das zum Einfrieren der MCF-12A Zellen verwendete Medium setzte sich aus 80 ml Ham's F-12 und den oben beschriebenen Zusätzen, sowie zusätzlich 10 % Pferdeserum und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) zusammen.

Hs 578T

Zur Zellkultivierung der Linie Hs 578T wurde ein Nährmedium aus 500 ml *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit L-Glutamin, 3,7 g/l NaHCO₃, 4,5 g/l D-Glucose mit oder ohne Phenolrot von *c.c.pro* bzw. *Biochrom* und Zugabe von 5 mg Insulin, 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 0,2 % Penicillin / Streptomycin und 0,5 % Amphotericin B verwendet.

Für die Kryokonservierung der Zelllinie Hs 578T wurde 80 ml des Nährmediums mit den oben beschriebenen Zusätzen mit zusätzlich 10 % FKS und 10 % DMSO versetzt.

HMEC

Für die empfindlichen HMEC wurde ein spezielles *Mammary Epithelial Cell Basal Medium* von PromoCell verwendet und 2 % *Mammary Epithelial Cell Supplement*, 0,2 % Penicillin / Streptomycin und 0,5 % Amphotericin B zugefügt.

3.2 METHODEN

3.2.1 KULTIVIERUNG DER ZELLEN

Zum Schutz der Zellkulturen vor mikrobieller Kontamination erfolgten die Kultivierung und Zelltestung in aseptischer Arbeitsweise an einer sterilen Werkbank.

Auftauen der Zellen

Zur Kultivierung der Zellen mussten diese zunächst aus der Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff (-190 °C) entnommen und in Zellkulturflaschen überführt werden. Die gefrorene Zellsuspension aus ca. 1×10^6 Zellen / ml Medium wurde aufgetaut und zusammen mit 5 ml Nährmedium in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Um das im Einfriermedium enthaltene zytotoxische DMSO zu entfernen, zentrifugierten wir die Suspension der MCF-12A-Zellen für 6 Minuten bei 1.200 Umdrehungen pro Minute (UpM) und die der HMEC- und Hs 578T-Zellen für 5 Minuten bei 1.000 UpM. Um das entstandenen Pellet nicht zu zerstören, wurde die Bremsfunktion der Zentrifuge auf 0 heruntergeregelt. Der Überstand über dem Pellet am Boden konnte abgezogen und das Pellet in 5 ml frischem Nährmedium resuspendiert werden. Die Suspension wurde in eine kleine (25 cm²) Zellkulturflasche überführt und in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Mediumwechsel

Das Wachstumsverhalten und die Morphologie der adhärennten Zellen wurde täglich lichtmikroskopisch überprüft und jeweils am zweiten bis dritten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierzu saugten wir das alte Medium von der unbewachsenen Seite der Zellkulturflasche mit einer Stabpipette ab und gaben je nach Größe der Flaschen 5, 15 oder 25 ml frisches Nährmedium hinzu.

Passagieren der Zellen

Bei einer Konfluenz von 70–80 % erfolgte das Passagieren und Überführen der Zellen in eine nächst größere Zellkulturflasche. Das alte Medium wurde dazu entfernt und die Zellen mit 5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Dabei werden Zell- und Medi-

umrückstände abgespült und divalente Kationen ausgewaschen, welche die Trypsinwirkung beeinträchtigen [99]. Anschließend erfolgte je nach Größe der Zellkulturflasche die Zugabe von 2,5 bis 5 ml Trypsin-EDTA in einer Verdünnung von 1:10 mit PBS. EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) spaltet als Ca^{2+} -Chelator vorwiegend die Zell-Zell-, Trypsin als proteolytisches Enzym die Zell-Matrix-Verbindungen, wodurch sich die Zellen aus dem Zellverband und von dem Kulturflaschenboden lösen [99]. Bis zum vollständigen Ablösen der Zellen von dem Flaschenboden erfolgte die Inkubation im Brutschrank bei 37 °C. Um eine Zellschädigung zu verhindern, wurde nach vollständigem Ablösen der adhären Zellen in Abhängigkeit der Trypsin-Menge 5–10 ml DMEM mit 10 % FKS zum Abstoppen der Trypsinierung hinzugegeben. Anschließend erfolgte das Überführen der Suspension mit einer Pipette in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen. Das Serum führt zu einer sofortigen Inaktivierung des Trypsins und bindet teilweise das zytotoxische EDTA [99]. Nach Zentrifugation für 5 Minuten ohne Bremsfunktion bei 1.000 UpM bzw. 1.200 UpM wurde der Überstand dekantiert und das Zell-Pellet in 5 ml Nährmedium mit der Pipette resuspendiert. Die Zellsuspension überführten wir in eine neue Zellkulturflasche. Nach Zugabe von 10 ml frischem Nährmedium bei einer 75 cm² Zellkulturflasche bzw. 20 ml Medium bei einer 150 cm² Zellkulturflasche wurden die frisch passagierten Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank inkubiert.

Kryokonservierung der Zellen

Die Langzeit-Aufbewahrung der Zellen erfolgte mittels Kryokonservierung bei -190 °C in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden je 1,5 ml Zellsuspension aus 1×10^6 Zellen und dem jeweiligen Einfriermedium in ein Kryoröhrchen gegeben. Diese kamen in einen speziellen Einfrierbecher, der mit gekühltem Isopropanol ummantelt ist. Dort verblieben sie für mindestens 10 Stunden bei -85 °C. Diese Prozedur ermöglicht das Herunterfrieren von 1 °C pro Minute. Anschließend folgte die Kryokonservierung im Flüssigstickstoff.

3.2.2 VORBEREITUNG DER TESTVERFAHREN

Um die biochemischen Assays und die Stoffwechsel-Tests bei Mehrfachtestung unter gleichen Bedingungen durchführen zu können, müssen die lebenden Zellen in einer definierten Anzahl auf die Mikrotiterplatten (MP) aufgebracht werden. Im Vorfeld ist daher die Bestimmung der Zellzahl in der jeweiligen Zellkulturflasche und anschließend die Verdünnung der Suspension auf die gewünschte Zell-Konzentration notwendig.

3.2.2.1 BESTIMMUNG DER ZELLZAHL

Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe einer Bürker-Zellenzählkammer (Abb. 10a). Dabei handelt es sich um eine flache Glaskammer von definierter Tiefe, die in ein Spezialglas von der Größe eines Objektträgers eingelassen ist. Sie besitzt zwei Zählnetze auf der Bodenfläche. Jedes Zählnetz zeigt 9 Großquadrate mit einer Fläche von je 1 mm^2 . Jedes Großquadrat enthält wiederum 4×4 Zählquadrate mit je $0,04 \text{ mm}^2$ Fläche und je 9 der kleinsten Zählquadrate mit einer Fläche von $0,0025 \text{ mm}^2$ (Abb. 10b) [211]. Werden nach Aufbringen eines Deckglases auf die Glaskammer die sogenannten Newtonschen Ringe sichtbar kann man von einem korrekten Sitz des Deckglases und einer definierten Zählkammertiefe von $0,1 \text{ mm}$ ausgehen, in der sich die Zellsuspension verteilt.

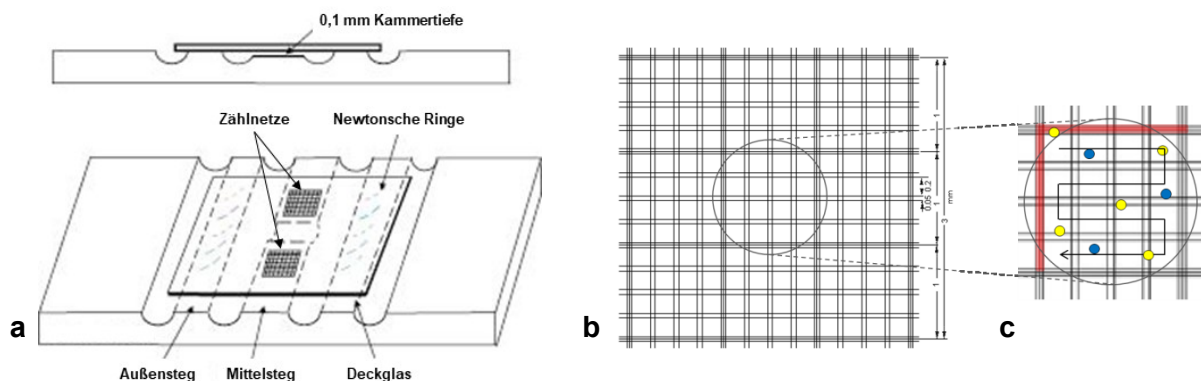


Abb. 10: a) Schematische Darstellung einer Zellenzählkammer, modifiziert nach Neuendorf 2015 [196]; b) Schematische Darstellung eines Zählnetztes nach Bürker; c) Mäanderförmiges Auszählen der vitalen Zellen in der Zählkammer, in Anlehnung an Gstraunthaler und Lindl 2013 [98].

Durchführung

Hierzu wurden die adhärennten Zellen zunächst analog der ersten oben beschriebenen Schritte zur Passagierung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und das entstandene Pellet in 5 ml Medium resuspendiert.

Zur Vorbereitung der Zellzählung wurden $360 \mu\text{l}$ des jeweiligen Nährmediums in ein $1,5 \text{ ml}$ fassendes Reaktionsgefäß pipettiert. Das Medium wurde mit $20 \mu\text{l}$ der vorbereiteten Zellsuspension und $20 \mu\text{l}$ Trypanblau versetzt und mit der Pipette durchgemischt, wodurch eine Verdünnung der Zellen von 1:20 entstand. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff aus der Gruppe der Azofarbstoffe, der durch eine defekte Zellmembran in das Zytosol der Zellen eindringen und als Anion an intrazelluläre Proteine binden kann. So färben geschädigte oder tote Zellen tiefblau an. Die intakte Zellmembran lebender Zellen kann der Farbstoff aufgrund seiner

Größe ($M = 960,8 \text{ g/mol}$) und Ladung nicht passieren. So ist gewährleistet, dass nur vitale, lichtmikroskopisch leuchtend hell erscheinende Zellen in die Zellzählung eingerechnet und tote, lichtmikroskopisch blaue Zellen, vernachlässigt werden [236].

Pro Zählnetz pipettierten wir $10 \text{ } \mu\text{l}$ der Suspension an die Kanten des Deckglases. Durch Kapillarkräfte wird die Suspension passiv in die beiden Bürker-Zellzählkammern gesaugt und verteilt sich dort gleichmäßig [99].

Mit dem Lichtmikroskop erfolgte das mäanderförmige Auszählen der vitalen Zellen (n) aus zwei verschiedenen Großquadraten (= 16 Kleinquadrate) pro Zählkammer (Abb. 10c). Dabei wurden die Zellen innerhalb des Großquadrats, sowie die auf dem oberen und linken Rand der Begrenzung liegenden Zellen eingeschlossen (Abb. 10b). Unter Berücksichtigung des Verdünnungs- ($\times 10$) und Kammerfaktors ($\times 10^4$) konnte mit folgender Formel (A) [236] die Gesamtzahl (n_{Gesamt}) der lebenden Zellen berechnet werden:

$$(A) \quad \frac{n_{\text{Gesamt}}}{\text{ml}} = n \times 10 \times 10^4$$

3.2.2.2 SUBSTANZVORBEREITUNG

Die Testsubstanzen Enterodiol, Enterolacton, Secoisolariciresinol und Matairesinol sowie die Kontrollsubstanzen 17β -Estradiol und Tamoxifen wurden in reiner, pulverisierter Form vom Forschungslabor der UFK Rostock kommerziell erworben.

Testsubstanzen

Im ersten Schritt wurden jeweils 5 mg der jeweiligen Substanz in 1 ml absoluten Ethanol (EtOH) gelöst, sodass von jedem Stoff eine Stammlösung mit einer Konzentration von $5000 \text{ } \mu\text{g/ml}$ entstand. Um den Einfluss der vier Lignane in unterschiedlichen Konzentrationen testen zu können stellten wir im zweiten Schritt für jedes Lignan eine Verdünnungsreihe mit dem jeweiligen Nährmedium her. Sie ist der Tab. 2 zu entnehmen. Mittels Vortex-Mixer wurde eine gleichmäßige Durchmischung der Substratlösungen während der Herstellung der Verdünnungsreihe sichergestellt. Auf den Mikrotiterplatten ergaben sich durch das Verhältnis von 1:100 zur Zellsuspension die Endkonzentrationen $50 \text{ } \mu\text{g/ml}$, $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$, $5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ und $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$.

Tab. 2: Verdünnungsreihe der Lignane

	Lignan-Konzentration [µg/ml]	Verdünnung	Zusammensetzung
1	5000	Stammlösung	5 mg Substanz + 1 ml EtOH abs.
2	1000	1:5	200 µl von 1 + 800 µl EtOH abs.
3	500	1:2	300 µl von 2 + 300 µl EtOH abs.
4	100	1:5	100 µl von 3 + 400 µl EtOH abs.

Kontrollsubstanzen

Als Basiskonzentration von Estradiol hat sich eine Konzentration von 1×10^{-9} mol/l bewährt. Hierzu wurden zunächst 2,7 mg Estradiol in 1 ml Ethanol absolut gelöst ($\triangleq 1 \times 10^{-2}$ mol/l) und mit Ethanol über eine Verdünnungsreihe auf 1×10^{-7} mol/l gebracht. Auf den Platten ergab sich so die Zielkonzentration von 1×10^{-9} mol/l.

Für das Tamoxifen lösten wir 5,6 mg der Substanz in 1 ml Ethanol absolut ($\triangleq 1 \times 10^{-2}$ mol/l), sodass wir auf den Mikrotiterplatten die gewünschte Konzentration von 1×10^{-4} mol/l erzielten.

3.2.3 IMMUNHISTOCHEMIE (IHC)

Die Immunhistochemie ist eine Methode zur Detektion von Zellstrukturen, sog. Epitopen, durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Das hier angewendete Verfahren beruht auf einem Farbumschlag am Ort der nachzuweisenden Epitope durch an Antikörper gekoppelte Enzyme. In dieser Arbeit wurden die Zelllinien mithilfe des *ImmPRESS UNIVERSAL Reagent Kit* von *Vector Laboratories* und dem *HRP-Substrate LinRed IHC* von *LINARIS* auf die Expression der Steroidrezeptoren ER α , ER β sowie den PR untersucht.

Bei dieser Nachweismethode bindet zunächst ein Primärantikörper spezifisch an das Epitop der Zelle, hier den entsprechenden Steroidrezeptor. Nachfolgend wird ein hochaffiner sekundärer Antikörper eingesetzt, der an ein Mikropolymer aus hochaktiven Enzymen, der sog. Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt ist. Bindet der Sekundärantikörper den Epitop-Primärantikörper-Komplex, kommt es zur Aktivierung der HRP. Bei Zugabe des *LinRed*-Substates entsteht durch dessen enzymatische Oxidation durch die Peroxidase ein roter Farbstoff (Abb. 11). So erscheinen Bereiche, die den jeweiligen Rezeptor tragen rot, während die übrigen rezeptorfreen Bereiche farblos bleiben.

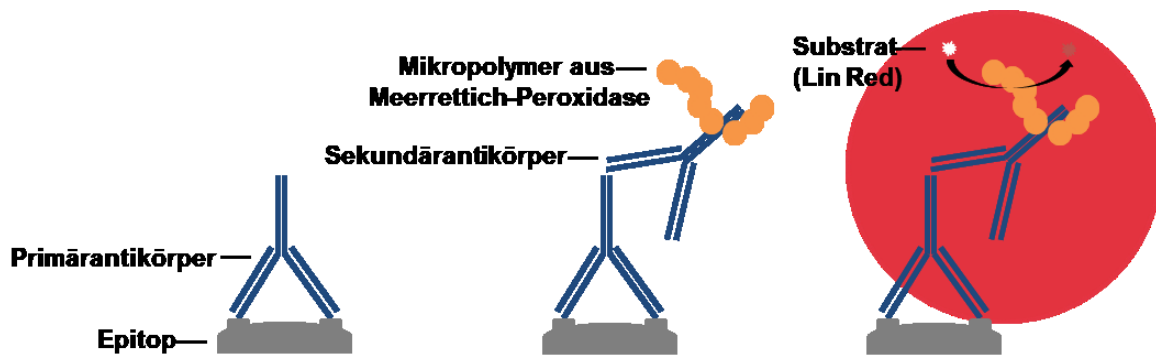


Abb. 11: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Reaktion, angelehnt an *Vector Laboratories* [279].

Durch Inkubation der Zellen mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) vor der immunhistochemischen Reaktion wird die endogene Peroxidase-Aktivität der Zellen gehemmt und durch Zugabe von Serum eine unspezifische Bindung des Enzymkomplexes an Proteine verhindert [280]. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch unspezifische Bindungen des Primärantikörpers oder durch Ablagerung von Farbstoffpigmenten im Medium auszuschließen wird eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper mitgeführt.

Durchführung

Zur Vorbereitung auf die Immunhistochemie wurde die Zellsuspension nach der Zellzählung auf 150–200.000 Zellen / ml mit dem jeweiligen Nährmedium verdünnt und je 300 μl / Well auf einer 24-Well Mikrotiterplatte ausgesät. Bis zur Ausbildung der zelltypischen Morphologie erfolgte die Inkubation für 48–72 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

Tag 1: Am 1. Tag wurde das Medium abgezogen und die Zellen drei Mal mit je 300 μl PBS / Well gewaschen. Die Zellen wurden mit je 300 μl Formafix 4 % / Well für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und erneut drei Mal wie oben beschrieben mit PBS gewaschen. Nach Inkubation mit je 300 μl 0,3 % H_2O_2 / Well für 30 Minuten mussten die Zellen erneut zweimalig mit PBS gewaschen und dabei jeweils für 5 Minuten mit dem PBS inkubiert werden. Nach der Zugabe von je 4 Tropfen Pferdeserum pro Well erfolgte eine Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Das Pferdeserum wurde dann, ausgenommen bei der Negativprobe, wieder entfernt und 200 μl Primärantikörper pro Well hinzugegeben. Hierbei wurde pro Zelllinie je ein Well mit einem ER α - und ER β -Antikörper, beide im Verhältnis 1:10 verdünnt mit PBS, sowie ein Well mit einem PR-Antikörper (*ready to use*) versehen und für 24 Stunden bei 8 °C im Kühlschrank inkubiert.

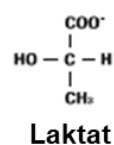
Tag 2: Am 2. Tag wurde der Primärantikörper entfernt, die Zellen wie oben beschrieben drei Mal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit je 4 Tropfen Sekundärantikörper pro Well bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation der Zellen mit 200 µl *LinRed*-Substrat pro Well für 5–30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Das Substrat wurde dekantiert und die Farbreaktion mit je 300 µl Leitungswasser (H₂O) pro Well abgestoppt.

3.2.4 LDH-ZYTOTOXIZITÄTSTEST

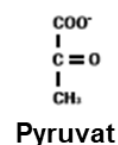
Der LDH-Test ist eine photometrische Methode, mit der *in-vitro* anhand der ermittelten LDH-Aktivität eine quantitative Aussage über das Ausmaß der Zellyse und damit der Zytotoxizität von Testsubstanzen getroffen werden kann. In dieser Arbeit wurde das *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)* von Roche verwendet.

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein stabiles intrazelluläres Enzym, das im Zytoplasma nahezu aller Zellen des Körpers vorkommt und dort den letzten Schritt der anaeroben Glykolyse katalysiert. Bei toten oder stark geschädigten Zellen kommt es zu einem Verlust der Integrität der Zellmembran. Die Zellmembran wird für große Moleküle permeabel und die hochmolekulare LDH wird rasch nach extrazellulär in das Zellkulturmedium freigesetzt [236]. Die Aktivität der akkumulierten LDH im Überstand kann dann mit Hilfe eines enzymatischen Tests ermittelt werden. Die Grundlage hierfür liefern die durch die Laktatdehydrogenase katalysierten biochemischen Reaktionen: Im ersten Schritt wird während der LDH-katalysierten Oxidation von Laktat zu Pyruvat das Coenzym NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert. Im zweiten Schritt wird ein weiteres Enzym, die Diaphorase, hinzugegeben. Diese katalysiert die Übertragung des H / H^+ von NADH / H^+ auf das ebenfalls zugefügte gelbe Tetrazoniumsalz 2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride) INT, welches dadurch zum roten Reaktionsprodukt Formazan reduziert wird (Abb. 12). Da dieser Farbstoff ein breites Extinktionsmaximum um 500 nm hat und das Tetrazolium Salz INT keine signifikante Extinktion bei diesen Wellenlängenbereich zeigt erfolgte die photometrische Bestimmung bei 490 nm [229].

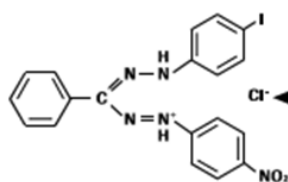
1. Reaktionsschritt



Laktatdehydrogenase



2. Reaktionsschritt



Katalysator

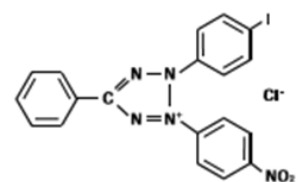


Abb. 12: Reaktionsschema des LDH-Testes, modifiziert nach Roche Applied Science 2005 [228].

Die Höhe der LDH-Aktivität im Zellüberstand korreliert direkt mit der Menge des gebildeten Farbstoffs Formazan in einer bestimmten Zeit, die sich wiederum proportional zur Anzahl lysierter Zellen verhält. So kann direkt auf die Zytotoxizität des jeweils zugegebenen Stoffs geschlossen werden.

Neben den Testsubstanzen werden einige Vergleichs- und Kontrollsubstanzen mitgeführt. Um die Zellschädigung unter Einwirkung der Substrate mit der Zellyse unbehandelter Zellen zu vergleichen wurde die Negativkontrolle 1 (NK 1) aus Zellen, Medium und dem Lösungsmittel Ethanol mitgeführt. Als Negativkontrolle 2 (NK 2) dienten Zellen, die nur mit Medium behandelt wurden. Sie lieferte eine Aussage über die LDH-Aktivität, die spontan von den Zellen ohne jegliche Zusätze freigesetzt wurde und ließ durch den Vergleich mit der Negativkontrolle 1 eine Aussage über die Zytotoxizität des Lösungsmittels Ethanol zu. Neben den Kontrollen mit Zugabe von Tamoxifen und 17 β -Estradiol wurde auch eine Positivkontrolle (PK) mit TritonX-100 durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen hoch zytotoxischen Stoff, der sich in die Lipiddoppelschicht der Membranen von Zellen einlagert und deren Permeabilität erhöht [99]. Die LDH-Aktivität in dieser Probe wird mit einem Zellschaden von 100 % gleichgesetzt. Die Eigenaktivität der LDH im Nährmedium wurde durch eine Hintergrundkontrolle ermittelt, die lediglich das jeweilige Nährmedium enthält. Bei den späteren Berechnungen musste dieser Wert von allen anderen Extinktionswerten subtrahiert werden.

Durchführung:

Tag 1: Für die LDH-Bestimmung erfolgte nach der Zellzählung (siehe Kapitel 3.2.2.1) die Verdünnung der Zellsuspension mit dem entsprechenden Medium auf 300.000 Zellen / ml. Je 100 μ l der verdünnten Zellsuspension wurden pro Well auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben und die Zellen bis zur Adhärenz am Boden für etwa 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Tag 2: Am zweiten Tag wurde das Nährmedium zunächst verworfen und durch 198 μ l frisches Nährmedium ersetzt. Bei der Zelllinie Hs 578T wurde Medium ohne Phenolrot und reduziertem FKS-Anteil (1 %) verwendet. Je 2 μ l der Testsubstanzen in den unterschiedlichen Verdünnungen sowie je 2 μ l Tamoxifen und 17 β -Estradiol wurden nach dem Schema in Abb. 13 auf die entsprechenden Wells gegeben. Ebenso verfahren wir mit dem Ansatz mit Ethanol absolut. In den Wells entstand so ein Verhältnis von der jeweiligen Substanz zur Zellsuspension von 1:100. Für die Triton-Kontrolle wurde TritonX-100 im Verhältnis von 1:100 mit dem jeweiligen Nährmedium verdünnt. Das Medium wurde aus den entsprechenden Wells entfernt und 200 μ l der 1 %-igen Triton-Medium-Suspension aufgetragen. Zu den

Wells in denen lediglich die LDH-Konzentration des Mediums bestimmt werden sollte wurden 200 µl Medium hinzugefügt. Den Zellen der NK 1 wurde über das Medium hinaus nichts Weiteres zugesetzt. Pro Ansatz wurden für alle Substanzen und Kontrollen stets 4 Wells befüllt. Die Mikrotiterplatte wurde nun für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

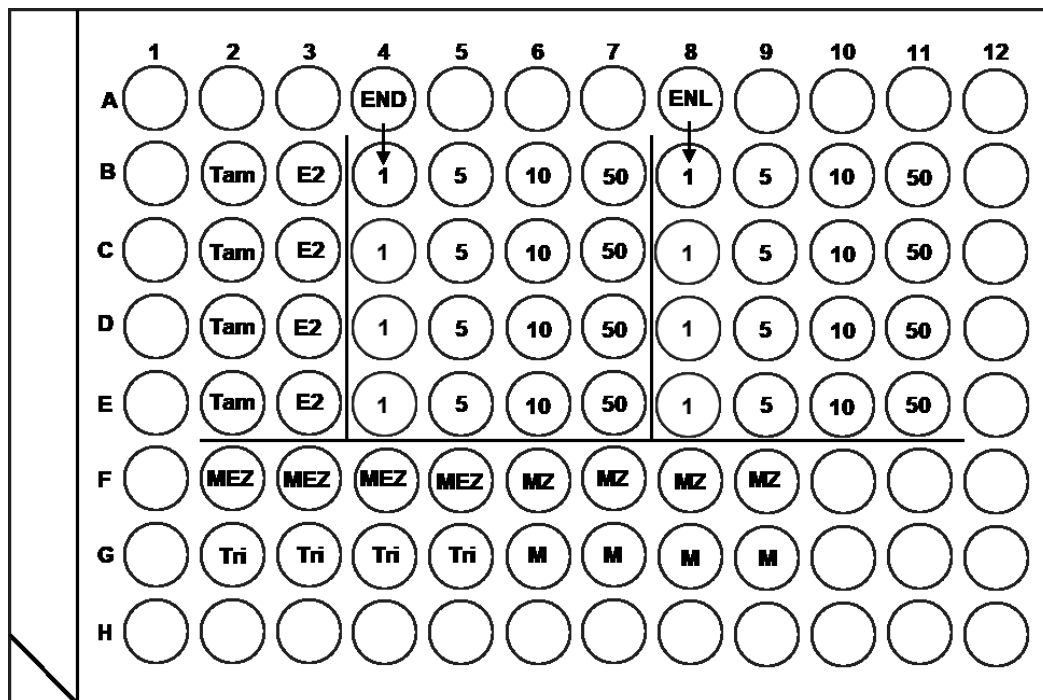


Abb. 13: Bestückungs-Schema der Mikrotiterplatten; Tam = Tamoxifen, E2 = Estradiol, END = Enterodiol, ENL = Enterolacton, 1–50 = Substanzkonzentration [µg/ml], MEZ = Medium + Ethanol + Zellen (NK 2), MZ = Medium + Zellen (NK 1), M = Medium, Tri = Triton (PK).

Tag 3: Am dritten Tag wurden aus jedem Well 100 µl des zellfreien Überstandes nach gleichem Auftragsprinzip in das äquivalente Well einer neuen 96-Well-Platte pipettiert. Die *Reaction Mixture* aus Katalysator und Farbstofflösung wurde herstellergerecht im Verhältnis 1:46 angesetzt und je 100 µl der Lösung auf jedes Well der neuen Mikrotiterplatte gegeben. Es folgte die Inkubation der Platte für 5–30 Minuten bei Raumtemperatur ohne Lichteinfluss und das Abstoppen der Reaktion mit 50 µl 1M Salzsäure (HCL) pro Well. Die Quantifizierung des Farbstoffes erfolgte photometrisch nach einer Mix-Zeit von 5 Sekunden bei 490 nm und einem Referenz-Filter von 620 nm mit dem *Microplate-Reader*. Die vom zugehörigen Computerprogramm *Microplate Manager* aufgetragenen Extinktionswerte wurden jeweils durch die Subtraktion der Hintergrundkontrolle korrigiert. Sie konnten dann in die folgende vom Hersteller vorgeschriebene Formel (B) eingesetzt und damit die Zytotoxizität im Vergleich zur Positivkontrolle berechnet werden.

$$(B) \text{ Zytotoxizität [\%]} = \frac{\text{Extinktion Testsubstanz} - \text{Extinktion Negativkontrolle}}{\text{Extinktion Positivkontrolle} - \text{Extinktion Negativkontrolle}} \times 100$$

3.2.5 BRdU-PROLIFERATIONSTEST

Mit dem BrdU-Test wird ergänzend zur Zytotoxizität die Wirkung der Testsubstanzen auf die Zellproliferation bestimmt. Es handelt sich um einen photometrischen Immunoassay mit dem *in-vitro* anhand der ermittelten Menge BrdU in der Zell-DNA eine quantitative Aussage über die Proliferation der Zellen gemacht werden kann. Hier wurde das *Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric) Kit* von Roche verwendet.

5-bromo-2'-deoxyuridine bzw. Bromdeoxyuridin (BrdU) ist ein synthetisches Pyrimidinanalogon, bei dem die 5'-Methylgruppe des Thymidins durch Brom ersetzt wurde (Abb. 14). Bei Zugabe zu den Zellen wird BrdU bei deren Proliferation anstelle der Base Thymidin durch die DNA-Polymerase in neu synthetisierte DNA eingebaut. Um die Zugänglichkeit des eingebauten BrdU für die Detektion durch den Antikörper zu verbessern werden die Zellen in einem Zwischenschritt fixiert und die DNA denaturiert. Mit Hilfe eines monoklonalen Peroxidasegekoppelten anti-BrdU-Antikörpers (*anti-BrdU-POD*) wird das eingebaute BrdU detektiert. Bei Zugabe des Substrates Tetramethylbenzidin (TMB), einem farblosen Chromogen, wird dieses durch die an den Antikörper gekoppelte Peroxidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Dieser kann photometrisch quantifiziert werden. Die Menge des entstandenen Farbstoffes korreliert direkt mit der Menge neu synthetisierter DNA und damit mit der Anzahl an proliferierenden Zellen [230].

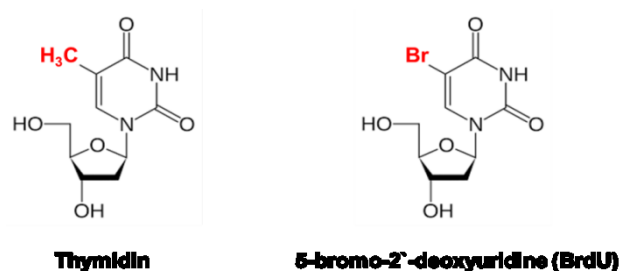


Abb. 14: Strukturelle Ähnlichkeit von Thymidin und BrdU, modifiziert nach *Bio-Rad Laboratories* 2018 [25].

Auch hier wurden Kontrollen mit 17 β -Estradiol und Tamoxifen, eine Negativkontrolle 1 mit Zellen, Medium und dem Lösungsmittel Ethanol, sowie eine Negativkontrolle 2 mit Nährmedium und Zellen durchgeführt. Ein Leerwert mit Nährmedium ohne Zellen wurde mitgeführt, um unspezifische Bindungen zwischen dem BrdU bzw. dem anti-BrdU-POD und der Mikrotiterplatte zu detektieren. Der Extinktionswert dieser Kontrolle musste später von allen Werten subtrahiert werden. Zusätzlich wurde anstatt der Triton-Kontrolle eine Hintergrundkontrolle ohne Zugabe von BrdU mitlaufen gelassen. Sie sollte unspezifische Bindungen des anti-BrdU-POD-Konjugats mit den Zellen in Abwesenheit von BrdU ausschließen.

Durchführung

Tag 1: Für die Bestimmung der Zellproliferation wurde die Zellsuspension nach der Zellzählung auf eine Zellzahl von 300.000 Zellen / ml mit dem entsprechenden Nährmedium verdünnt. Je 100 µl der Zellsuspension wurden pro Well auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Bis zur Adhärenz erfolgte die Inkubation der Ansätze für etwa 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

Tag 2: Am zweiten Tag wurde das Medium durch 100 µl frisches Nährmedium, bei der Linie Hs 578T ohne Phenolrot, ersetzt. Jeweils 1 µl der Substanz-Verdünnungen, sowie je 1 µl Tamoxifen, Estradiol und Ethanol absolut wurden pro Well nach dem gleichen Schema wie beim LDH-Test aufgetragen (Abb. 13). Das Verhältnis von Zusätzen zur Zellsuspension betrug nun in jedem Well 1:100. Auch hier wurden pro Ansatz für alle Substanzen und Kontrollen stets 4 Wells bestückt. Es folgte erneut die Inkubation der Mikrotiterplatte für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂.

Tag 3: Am 3. Tag wurde das *BrdU labeling reagent* im Verhältnis 1:100 mit dem entsprechenden Nährmedium verdünnt. Ausgenommen der Hintergrundkontrolle wurden je 10 µl der Lösung pro Well aufgetragen und 3 Stunden inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das *BrdU labeling reagent* abgeklopft, je 200 µl *FixDenat solution* je Well aufgetragen und die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Lösen in 1,1 ml zweifach destilliertem Wasser erfolgte die Verdünnung des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers *anti-BrdU-POD* im Verhältnis 1:100 mit *Antibody dilution solution*. Nach Abklopfen der *FixDenat solution*-Lösung wurde je 100 µl des verdünnten Antikörpers *anti-BrdU-POD* pro Well aufgetragen und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschpuffer wurde im Verhältnis von 1:10 mit zweifach destilliertem Wasser verdünnt und die Zellen, um ungebundene Antikörper zu entfernen 3 Mal mit dem verdünnten Waschpuffer gewaschen. Dieser wurde wieder entfernt und die Zellen mit je 100 µl *Substrat solution* pro Well, die das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) enthält, für ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 25 µl 1M Schwefelsäure (H₂SO₄) pro Well abgestoppt, wodurch ein stabiler gelber Farbstoff entstand. Die photometrische Messung erfolgte nach einer Mix-Zeit von 35 Sekunden bei 450 nm mit einem Referenz-Filter von 620 nm im *Microplate-Reader*. Die Extinktionswerte wurden vom *Microplate Manager* aufgetragen, durch Subtraktion des Leerwertes korrigiert und anschließend die Zellproliferation mit folgender Formel (C) berechnet:

$$(C) \text{ Zellproliferation [\%]} = \frac{\text{Extinktion Testsubstanz}}{\text{Extinktion Negativkontrolle}} \times 100$$

3.2.6 UNTERSUCHUNG DES OXIDATIVEN STRESSES UND DES ZELLMETABOLISMUS

3.2.6.1 BESTIMMUNG DES OXIDATIVEN STRESSES

Der *Hydrogen Peroxide Assay* von *BioVision* ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Wasserstoffperoxid als Marker für oxidativen Stress *in-vitro*.

Sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxyl-Radikale (OH^\cdot) sind Nebenprodukte des regulären aeroben Zellstoffwechsels. Im Organismus werden diese unter physiologischen Bedingungen von enzymatischen Antioxidantien wie beispielsweise der Superoxid-Dismutase oder der Glutathion-Peroxidase sowie nicht-enzymatischen Antioxidantien wie Glutathion oder Ascorbinsäure neutralisiert [248]. Oxidativer Stress entsteht, wenn die antioxidative Kapazität des Organismus überschritten wird und ROS mit zelleigenen Bestandteilen wie Proteinen, Lipiden und der DNA reagieren.

Im Assay reagiert H_2O_2 in Anwesenheit von Meerrettich-Peroxidase (HRP) mit dem Chromogen 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (*OxiRed*) zu einem pinken Farbstoff mit einer maximalen Wellenlänge von 570 nm (Abb. 15). Dieser kann photometrisch mittels *Microplate-Reader* bestimmt und über eine H_2O_2 -Standardkurve die H_2O_2 -Menge in den Proben und im Anschluss die H_2O_2 -Konzentration berechnet werden.

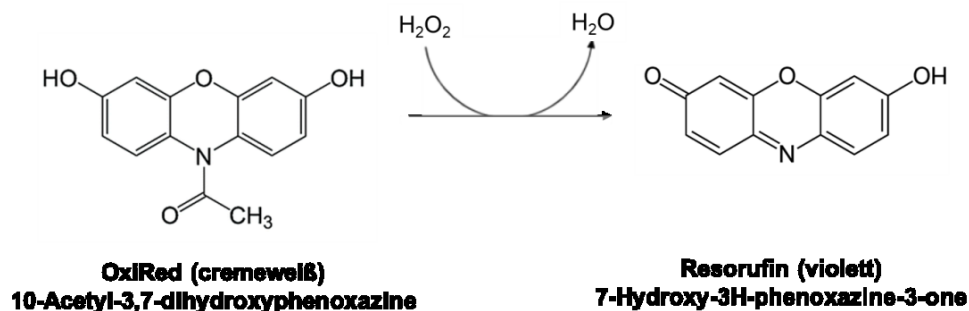


Abb. 15: Reaktionsschema des *Hydrogen Peroxide Assays*, angelehnt an Held 2003 [109].

3.2.6.2 BESTIMMUNG DER GLUKOSEKONZENTRATION

Die quantitative Bestimmung der Glukosekonzentration im Zellüberstand beruht auf einem elektrochemischen Messprinzip und erfolgte mit dem Glukosemessgerät *ecoTwenty* der Firma *CARE diagnostica*.

Glukose stellt für jede lebende Zelle, sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro*, eine der wichtigsten Energiequellen dar. Daher ist Glukose bei den meisten Nährmedien in physiologischer (1 g/l, 5,5 mM) oder bei schnell proliferierenden Zellen in erhöhter Konzentration (4,5 g/l, 25 mM) zugesetzt [99]. Die Glukosekonzentration im Zellüberstand liefert eine indirekte Aussage über den Glukose-Verbrauch und damit die Vitalität der Zellen unter dem Einfluss der unterschiedlichen Substanzen

Bei dem für dieses Messprinzip verwendeten Glukosesensor handelt es sich um einen Biosensor, in den eine Biomembran eingebracht ist. An die Membran ist das Enzym Glukoseoxidase (GOD) gekoppelt. Ist β -D-Glukose in der Probe enthalten, wird es durch die Glukoseoxidase enzymatisch zu D-Gluconsäure und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das entstandene H_2O_2 wird unter Abgabe von Elektronen an einer Platinelektrode (Pt) oxidiert und der resultierende Stromfluss detektiert (Abb. 16). Der Stromfluss verhält sich proportional zu der Glukosekonzentration in der Probe und wird vom Messgerät direkt in eine Konzentrationsangabe umgerechnet.

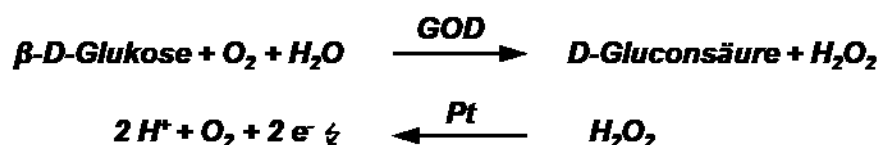


Abb. 16: Reaktionsschema der Glukosebestimmung, modifiziert nach Zier *et al.* 1988 [309].

3.2.6.3 BESTIMMUNG DES pH-WERTES

Die pH-Bestimmung wurde mit dem *ORION 3 STAR Benchtop pH meter* von *Thermo Fisher Scientific* durchgeführt. Da Metaboliten des Zellstoffwechsels, wie beispielsweise Laktat, das extrazelluläre Milieu in charakteristischer Weise verändern können wird auch der pH-Wert als Marker für die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt.

Das pH-Meter ist mit einer speziellen Messelektrode aus Glas ausgestattet. Im Inneren der Glaselektrode befindet sich eine Pufferlösung mit konstantem pH, in der nahe der Glasmembran eine Ableitelektrode (z. B. Ag / AgCl) und gleichzeitig eine Bezugselektrode

(Hg / Hg₂CL₂ in KCL-Lösung) eingebracht sind. In Abhängigkeit von der Wasserstoffionen-konzentration in der Messlösung bildet sich an der Glasmembran ein elektrisches Potenzial aus. Die Potenzialdifferenz zur Bezugselektrode ist direkt proportional zum pH-Wert der Lösung [303].

3.2.6.4 DURCHFÜHRUNG DER STOFFWECHSEL-UNTERSUCHUNGEN

Wie bei den biochemischen Assays mussten die Zellen für die Stoffwechselanalysen zunächst vom Flaschenboden abgelöst, gezählt und auf 300.000 Zellen / ml verdünnt werden. Je 100 µl Zellesuspension pro Well wurde auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und nach Schema des LDH-Testes (Abb. 13) bis zum Tag 3 verfahren. Am 3. Versuchstag, also nach etwa 24-stündiger Inkubation mit den Substanzen, wurden jeweils 100 µl des Überstandes aus den 4 identischen Ansätzen jeder Test- und Kontrollsubstanz in ein gemeinsames 1,5 ml messendes Reaktionsgefäß überführt. Diese Suspension wurde für 15 Minuten mit 2.500 UpM zentrifugiert und der Überstand als Grundlösung für die drei Stoffwechsel-Tests verwendet.

Oxidativer Stress

Zur Bestimmung von H₂O₂ aus dem Überstand wurden je 50 µl aus der jeweiligen Grundlösung auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Für die H₂O₂-Standardkurve wurde die H₂O₂-Standardlösung mit destilliertem Wasser verdünnt und in den Konzentrationen 0 nmol, 1 nmol, 2 nmol, 3 nmol, 4 nmol und 5 nmol / Well auf eine weitere Well-Platte gegeben. 50 µl *Reaction Mix* aus 46 µl *Assay Buffer*, 2 µl *OxiRed™ Probe solution* und 2 µl *HRP solution* wurden pro Well zu jeder Probe und jedem Standard hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Die photometrische Bestimmung des entstandenen Farbstoffes erfolgte mittels *Microplate-Reader* bei einer Wellenlänge von 570 nm. Zur Korrektur der Hintergrundaktivität wurde von allen Extinktionswerten der Proben und Standards die Extinktion des Standards mit 0 nmol H₂O₂ subtrahiert. Anhand einer H₂O₂-Standardkurve und der entsprechenden Funktion konnte daraus die Menge H₂O₂ (in pmol) in den Proben bestimmt und die H₂O₂-Konzentration (in [pmol/µl]) mit folgender Formel (D) berechnet werden:

$$(D) \quad \text{H}_2\text{O}_2\text{-Konzentration [pmol/}\mu\text{l]} = \frac{\text{H}_2\text{O}_2\text{-Konzentration Probe [pmol]}}{\text{Volumen Probe [}\mu\text{l]}}$$

Glukoseverbrauch

Aus den Mediumüberständen der jeweils einzelnen Ansätze wurden für den Stoffwechsel-Test je 20 µl entnommen und mit 1 ml der Systemlösung in ein 1,5 ml fassendes Reagenzgefäß gegeben. Mittels Glukose-Analysegerät *ecoTwenty* von *CARE diagnostics* erfolgte daraus die elektrochemische Bestimmung der Glukose-Konzentration. Der Glukoseverbrauch wurde relativ zum Verbrauch unbehandelter Zellen (NK 1) mit folgender Formel (E) berechnet:

$$(E) \text{ Glukoseverbrauch [\%]} = \frac{\text{Glukosekonzentration Negativkontrolle}}{\text{Glukosekonzentration Testsubstanz}} \times 100$$

pH-Wert

Hierfür wurde das pH-Messgerät zunächst mit Hilfe der verschiedenen standardisierten Pufferlösungen kalibriert, anschließend folgten die Analysen. Um Messfehler zu reduzieren erfolgte zwischen den einzelnen Messungen die Reinigung der Messsonde mit destilliertem Wasser.

3.2.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2010 und IBM SPSS Statistics Version 22.

Mit dem Kolgomorov-Smirnov-Test wurden die Datensätze auf Normalverteilung geprüft. Da der Einfluss mehrerer Stoffe getestet wurde und nicht alle Messreihen eine Normalverteilung zeigten erfolgte dann zunächst der Kruskal-Wallis-Test für mehrere, nicht-normalverteilte unabhängige Stichproben und im Anschluss der paarweise Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test.

Das Signifikanzniveau wurde in dieser Arbeit auf 5 % festgelegt.

IV. ERGEBNISSE

Im Folgenden wird der Einfluss der Lignane Enterolacton (ENL), Enterodiol (END), Secoisolariciresinol (SECO) und Matairesinol (MATA) in vier unterschiedlichen Konzentrationen (1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml und 50 µg/ml) auf die Zelllinien MCF-12A, HMEC und Hs 578T dargestellt und mit der Wirkung der Kontrollsubstanzen 17β-Estradiol (1×10^{-9} mol/l) und dem SERM Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l) verglichen. Hierzu werden zunächst die Resultate des immunhistochemischen Rezeptornachweises und nachfolgend die Ergebnisse der biochemischen Assays, des oxidativen Stresses und der Stoffwechseluntersuchungen demonstriert.

Bei den Zelllinien MCF-12A und Hs 578T wurden der LDH- und BrdU-Test je vier- bis fünfmal und die Stoffwechsel-Tests je ein- bis dreimal mit einer Zellzahl von 300.000 / ml mit jeweils vier Ansätzen durchgeführt. Aufgrund der begrenzten Kultivierbarkeit und Kostenintensivität erfolgten die Versuche bei der Primärkultur der HMEC einmalig mit vier Ansätzen und einer reduzierten Zellzahl von 200.000 / ml. Da jeweils nur zwei der Lignane mit den jeweiligen Verdünnungen auf einer gemeinsamen Platte geprüft werden konnten, lagen für die Kontrollsubstanzen und Negativproben jeweils die doppelte Anzahl an Daten vor. Sie wurden in den Graphiken der einzelnen Lignane für eine bessere Vergleichbarkeit zusammengefasst

Die in den biochemischen Assays und den Untersuchungen des Zellmetabolismus mitgeführten Negativkontrollen (NK 1 = Zellen + Medium und NK 2 = Zellen + Medium + Ethanol) zeigten bei den Zelllinien MCF-12A und Hs 578T in keinem der Versuche einen signifikanten Unterschied. Der Einfluss des Ethanols in der verwendeten Konzentration konnte also bei diesen Zelllinien vernachlässigt und für die statistischen Vergleiche die NK 1 repräsentativ für unbehandelte Zellen als Negativkontrolle verwendet werden. Bei der Primärkultur der HMEC zeigten sich bei dem BrdU-Test hingegen deutlich abweichende Werte der NK 1 und NK 2. Da eine Beeinflussung durch das Lösungsmittel nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde bei der dritten Zelllinie bei allen Tests die NK 2 als Vergleichswert herangezogen.

Die Graphiken zeigen stets die Durchschnittswerte aus allen verwendeten Passagen. In den Abbildungen wurden signifikante Werte folgendermaßen markiert: $p < 0,001$: **, $p = 0,001-0,05$: *; Punkte: Ausreißer.

4.1 IMMUNHISTOCHEMIE:

Zur Charakterisierung der Zelllinien anhand des Hormonrezeptorstatus wurden diese mittels Immunhistochemie auf die Expression der Steroidrezeptoren Estrogenrezeptor α , Estrogenrezeptor β sowie des Progesteronrezeptors untersucht. Exprimieren die Zellen den jeweiligen Rezeptor, zeigen sie durch die Antikörper-gekoppelte enzymatische Reaktion eine rote Färbung. Die Beurteilung der Farbreaktion erfolgte mit dem Lichtmikroskop. Die Negativkontrolle (NK) blieb bei allen Zelllinien ohne Färbung, sodass eine Verfälschung des Nachweises durch Farbstoffpartikel im Medium oder unspezifische Bindungen des Primärantikörpers ausgeschlossen werden konnte.

MCF-12A

Bei der immunhistochemischen Untersuchung konnten sowohl die Expression beider Estrogenrezeptoren als auch des Progesteronrezeptors durch eine deutliche rote Färbung des Zytoplasmas der Zellen nachgewiesen werden (Abb. 17).

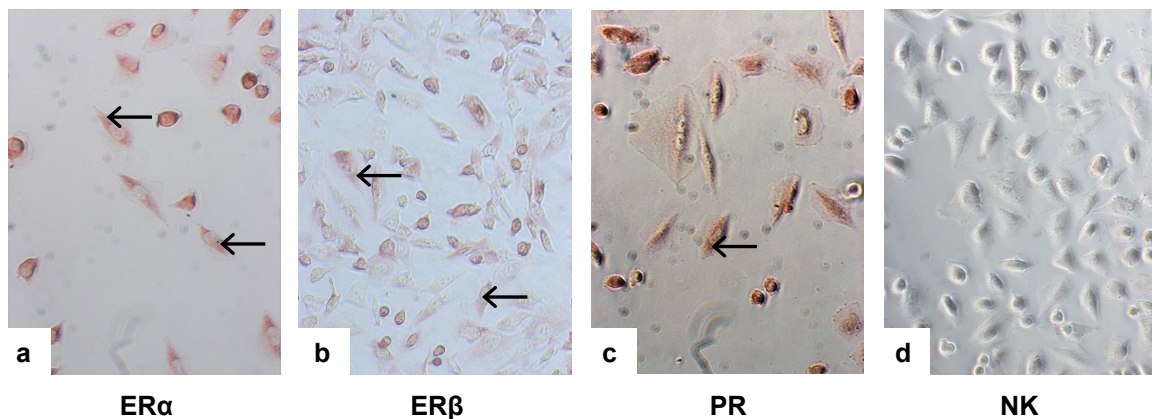


Abb. 17: Immunhistochemie der Zelllinie MCF-12A; Lichtmikroskopische Aufnahme; a) Estrogenrezeptor α positiv (Vergrößerung 20 x); b) Estrogenrezeptor β positiv (Vergrößerung 10 x); c) Progesteronrezeptor positiv (Vergrößerung 20 x); d) Negativkontrolle (Vergrößerung 20 x), Positive Zellen exemplarisch mit schwarzem Pfeil markiert.

HMEC

Die Primärkultur der HMEC zeigte, wie auch die Zellreihe MCF-12A, eine deutliche rote Färbung der Zellen bei der immunhistochemischen Untersuchung aller drei Rezeptoren und damit einen positiven Nachweis für deren Expression (Abb. 18).

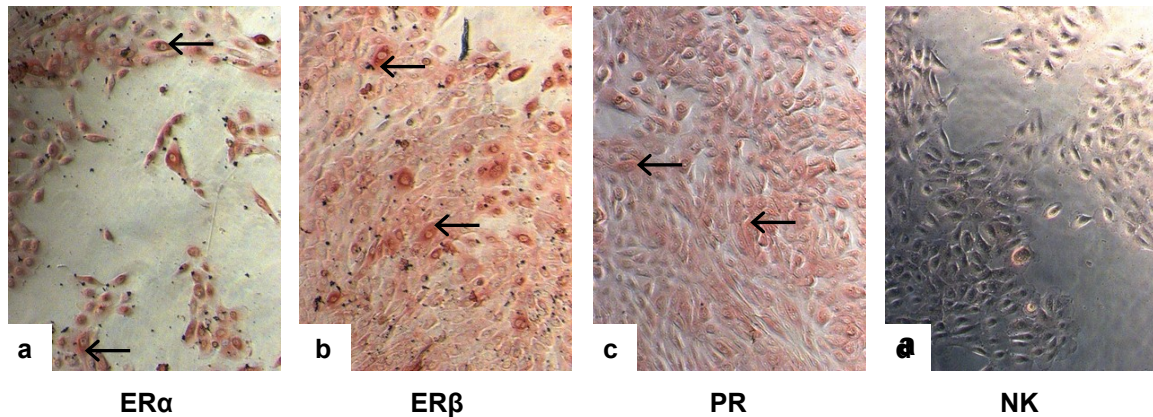


Abb. 18: Immunhistochemie der HMEC; Lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 10 x); a) Estrogenrezeptor α positiv; b) Estrogenrezeptor β positiv; c) Progesteronrezeptor positiv; d) Negativkontrolle. Zur Verfügung gestellt vom Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock. Positive Zellen exemplarisch mit schwarzem Pfeil markiert.

Hs 578T

Die Zellen der Linie Hs 578T blieben bei der immunhistochemischen Untersuchung des ER α und des PR ungefärbt. Lediglich beim ER β zeigte sich eine starke rote Farbreaktion des Zytoplasmas, die als positiver Rezeptornachweis zu bewerten war (Abb. 19).

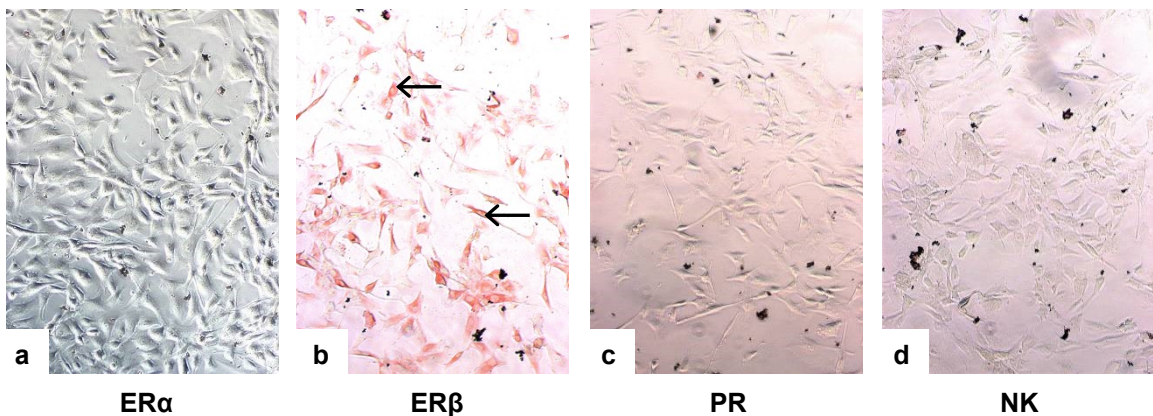


Abb. 19: Immunhistochemie der Zelllinie Hs 578T; Lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 10 x); a) Estrogenrezeptor α negativ; b) Estrogenrezeptor β positiv; c) Progesteronrezeptor negativ; d) Negativkontrolle. Positive Zellen exemplarisch mit schwarzem Pfeil markiert.

4.2 LDH-ZYTOTOXIZITÄTSTEST

Zur quantitativen Bestimmung der Zytotoxizität der verschiedenen Test- und Kontrollsubstanzen wurde der LDH-Test durchgeführt. Bei diesem Verfahren wurde nach 24-stündiger Inkubation die LDH-Aktivität und damit die Zellyse unter Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen anhand einer enzymatischen Farbreaktion dargestellt. Die Menge des Farbstoffes konnte photometrisch bestimmt und aus den daraus ermittelten Extinktionswerten die Zytotoxizität in Prozent berechnet werden. Sie entspricht der relativen Zytotoxizität im Vergleich zu TritonX-100, die einer Zellschädigung von 100 % gleichgesetzt wurde. Die Zytotoxizität der Probe mit Medium und Zellen (NK1) entspricht 0 % und gilt als Vergleichswert für die statistischen Tests.

MCF-12A

Der Versuch wurde 4 Mal mit jeweils 4 Ansätzen ($n = 4 \times 4$) pro Substrat durchgeführt. Dabei wurden die Zellen der Passagen 26 bis 30 verwendet.

Im Gegensatz zu den anderen beiden Zelllinien ließen sich bei den Kontrollsubstanzen und der Negativkontrolle einige Ausreißer erkennen.

Insgesamt führte keines der Lignane in den verwendeten Substratkonzentrationen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen der NK 1 zu einer signifikanten Zellschädigung (Abb. 20). Unter dem Einfluss von ENL zeigte sich eine Abnahme der Zytotoxizitäten bei steigender Substratkonzentration (Median 6,5 % bis -2,3 %), bei END verringerte sich die zytotoxische Wirkung von ca. 3,8 % bei 1–10 µg/ml auf -1,1 % bei 50 µg/ml. Unter SECO (Median -3,5 % bis -7,6 %) und MATA (Median -3,5 % bis -11,6 %) zeigten sich signifikant geringere Zytotoxizitäten als bei der NK 1. Eine eindeutige konzentrationsabhängige Wirkung ließ sich nicht ableiten.

Der Effekt von 17β-Estradiol lag mit einer Zytotoxizität von -1,4 % im Bereich der NK 1. ENL in der Konzentration 1 µg/ml und MATA in Konzentrationen ≥ 5 µg/ml zeigten im Vergleich dazu signifikant niedrigere Werte ($p < 0,05$). Im Vergleich zum SERM Tamoxifen (Median 120,1 %) war sowohl die zellschädigende Wirkung der vier Lignane in allen getesteten Konzentrationen als auch der NK 1 und des 17β-Estradiols signifikant geringer ($p < 0,001$).

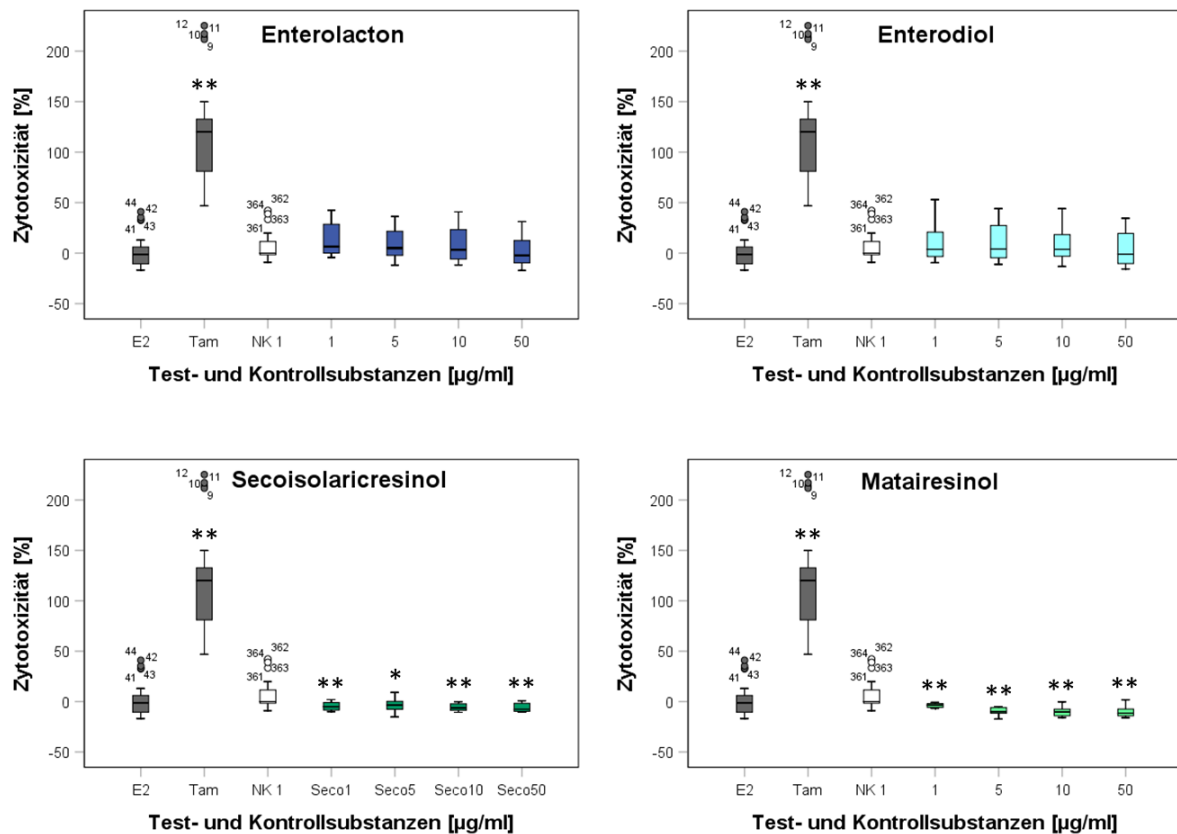


Abb. 20: Zytotoxische Wirkung der Test- und Kontrollsubstanzen auf die Zelllinie MCF-12A im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17 β -Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [μ g/ml]; n = 4 x 4.

HMEC

Bei der Primärkultur der HMEC wurde der Versuch einmalig mit 4 Ansätzen (n = 1 x 4) mit den Zellen der 5. Passage durchgeführt.

Die Spannweite der Ergebnisse war gegenüber den anderen beiden Zelllinien deutlich kleiner. Im Vergleich zur NK 2 zeigten sich unter Lignan-Einfluss weitestgehend leicht negative Zytotoxizitäten, SECO in der Konzentration 10 μ g/ml (Median 1,4 %) sowie MATA in den Konzentrationen 1 μ g/ml und 50 μ g/ml (0,8 % und 0,2 %) hingegen leicht positive Werte, die sich allesamt nicht signifikant von derjenigen der NK 2 und des 17 β -Estradiols unterschieden (Abb. 21).

Die Wirkung von 17 β -Estradiol hob sich in der verwendeten Konzentration ebenfalls nicht-signifikant von der Kontrolle (Median 1,2 %) ab. Tamoxifen induzierte relativ zur Positivkontrolle mit Triton auch bei gesunden Mammaepithelzellen starke signifikant zytotoxische

Effekte (Median 105 %, $p < 0,001$). Im Vergleich zu Tamoxifen übten alle Lignane sowie das 17 β -Estradiol eine signifikant geringe Zellschädigung aus ($p < 0,05$).

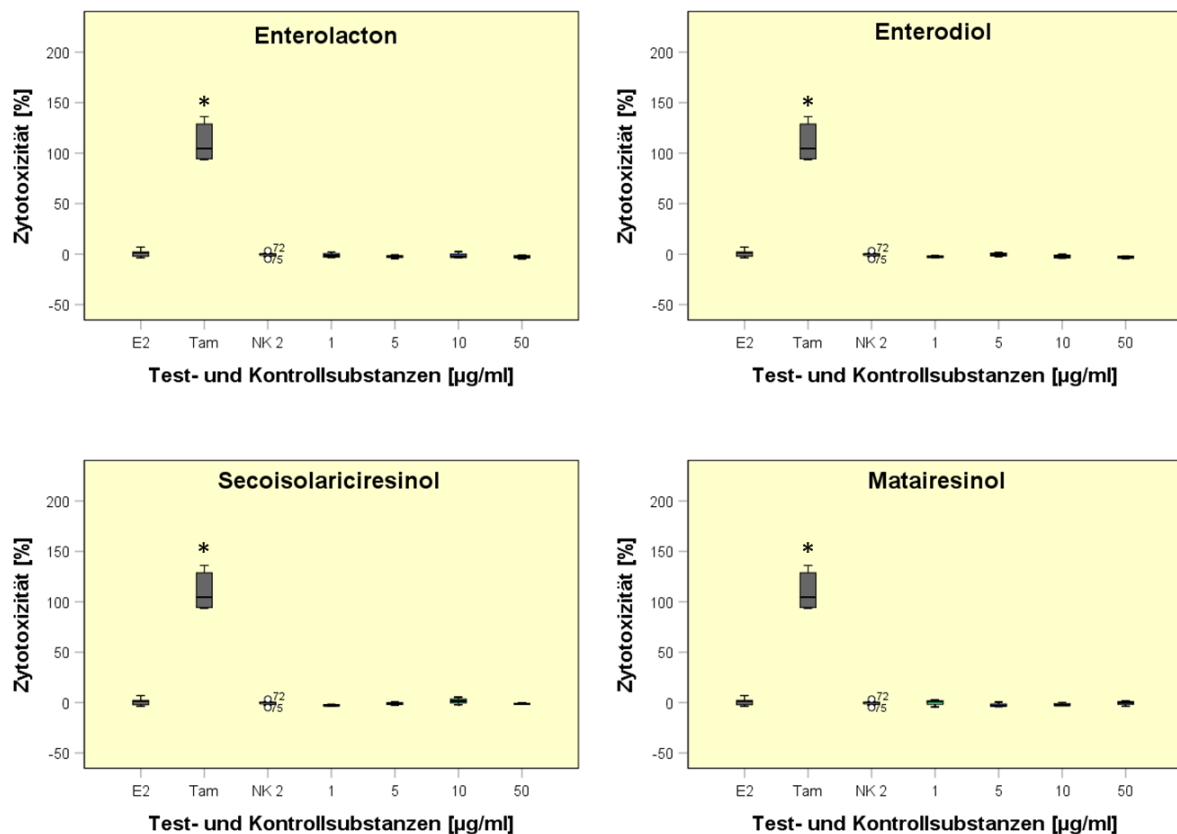


Abb. 21: Zytotoxische Wirkung der Test- und Kontrollsubstanzen auf die HMEC im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17 β -Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 2 = Medium + Zellen + Ethanol, 1–50 = Substanzkonzentration [μ g/ml]; $n = 1 \times 4$.

Hs 578T

Der LDH-Test wurde auch bei dieser Zelllinie 5 Mal mit jeweils 4 Ansätzen ($n = 5 \times 4$) durchgeführt, wobei die Passagen 10 bis 19 verwendet wurden.

Insgesamt zeichneten sich die Ergebnisse im Vergleich zur Zelllinie MCF-12A und zur Primärkultur der HMEC durch deutlich höhere Spannweiten und Interquartilabstände aus. SECO und MATA induzierten in allen verwendeten Konzentrationen (Median 3,0–19,1 % bzw. 0,7–31,6 %), ENL nur bei 1 μ g/ml und 50 μ g/ml (Median 1,8 % und 12,6 %) zytotoxische Effekte (Abb. 22). Bei SECO war die zellschädigende Wirkung am stärksten in der höchsten Konzentration (Median 19,1 %) und bei Mata in der niedrigsten Konzentration (Median 31,6 %) ausgeprägt. Trotz Ausreißern unterschied sich letztere ($p = 0,001$) als einzige Mess-

reihe signifikant zur NK 1. Im Gegensatz zu den anderen drei Lignanenen zeigte sich unter END im Vergleich zu unbehandelten Zellen (NK1) keine zellschädigende Wirkung. Die Zytotoxizität sank konzentrationsabhängig – von 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml bis 50 µg/ml – deutlich ab (Median -8,1 %, -26,5 %, -43,1 % und -47,8 %), der Unterschied war aber nur bei den Konzentrationen 5 µg/ml und 10 µg/ml signifikant ($p < 0,05$).

17β-Estradiol zeigt eine leichte, nicht-signifikant höhere Zytotoxizität als die unbehandelten Zellen der NK. Mata in der Konzentration 1 µg/ml unterschied sich als einzige Messreihe signifikant von der Zytotoxizität des 17β-Estradiol ($p < 0,001$).

Tamoxifen wirkte auch bei den ERα- negativen Zellen stark zytotoxisch (Median 122 %). Die zellschädigende Wirkung lag signifikant höher als diejenige der Test- und Kontrollsubstanzen ($p < 0,001$).

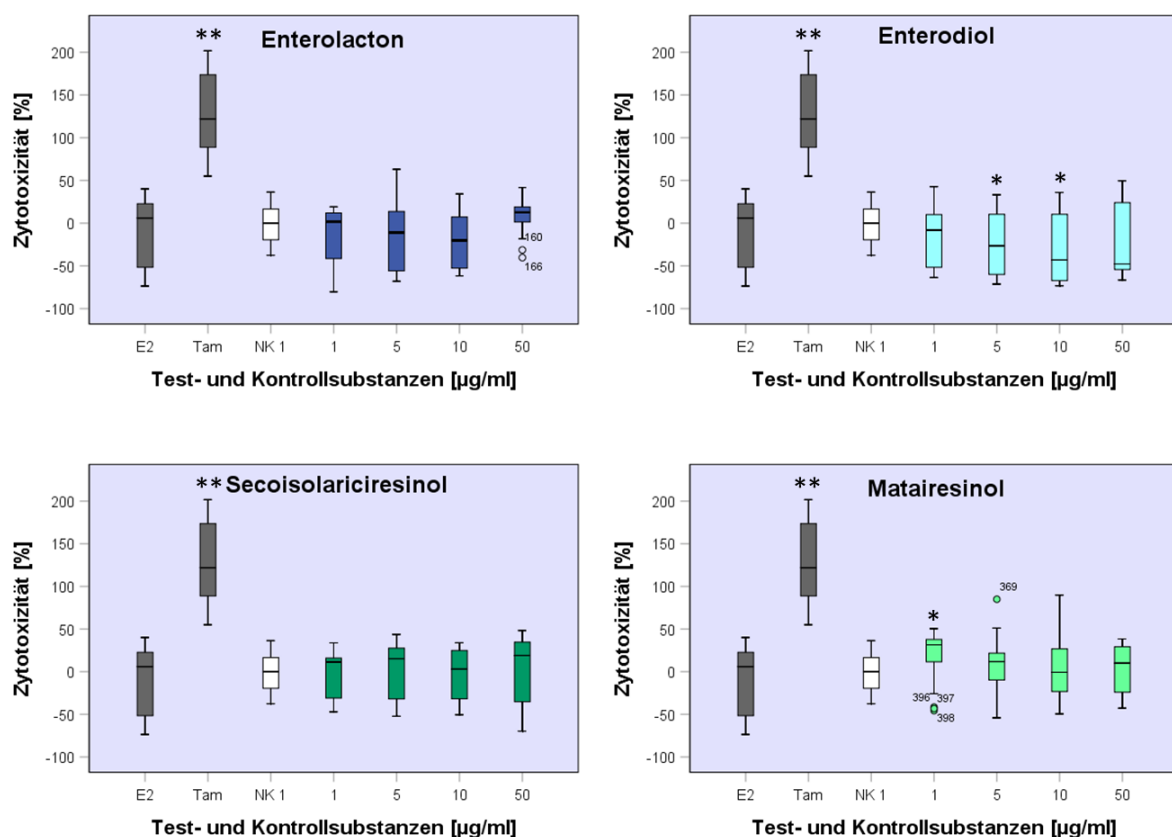


Abb. 22: Zytotoxische Wirkung der Test- und Kontrollsubstanzen auf die Zelllinie Hs 578T im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17β-Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [µg/ml]; $n = 5 \times 4$.

4.3 BRDU-ZELLPROLIFERATIONSTEST

Die Proliferation der Zellen unter Einfluss der unterschiedlichen Test- und Kontrollsubstanzen wurde mittels BrdU-Test untersucht. Bei diesem Immunoassay wird der Gehalt des Thymidin-Analogons BrdU in den Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit den Substraten anhand einer Antikörper-gekoppelten enzymatischen Farbreaktion ermittelt. Die Menge des entstandenen Farbstoffes kann photometrisch bestimmt und anhand der Extinktionswerte die Zellproliferation in Prozent berechnet werden. Sie entspricht der relativen Zellproliferation zu unbehandelten Zellen (NK 1), die einer Proliferation von 100 % gleichgesetzt wird.

MCF- 12A

Bei dieser Zelllinie wurde der Versuch 5 Mal mit jeweils ebenfalls 4 Ansätzen ($n = 5 \times 4$) pro Substrat durchgeführt. Dabei wurden die Passagen 25 bis 35 verwendet

ENL, END und MATA führten bei den ER-positiven Zellen zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen (NK 1) (Abb. 23). ENL zeigt dabei den stärksten Einfluss. In der höchsten Substratkonzentration von 50 µg/ml wurde die Proliferation auf etwa 24 % des Vergleichswertes reduziert ($p < 0,001$). Unter dem Einfluss von 50 µg/ml END zeigte sich eine Hemmung auf ca. 59 % ($p < 0,001$), bei 50 µg/ml MATA auf ca. 70 % ($p < 0,001$). Ausgenommen unter der Substanzkonzentration von 1 µg/ml MATA waren die Unterschiede zur Negativkontrolle signifikant. SECO hingegen übte lediglich in der Konzentration von 1 µg/ml einen leichten, aber signifikanten antiproliferativen Einfluss auf die Zellen aus (Median 91 %, $p < 0,05$), bei Konzentrationen ≥ 5 µg/ml lag die Proliferation im Bereich der unbehandelten Zellen (Median 96–100 %).

17β-Estradiol zeigte einen leichten, nicht-signifikanten, antiproliferativen Effekt auf die MCF-12A-Zellen (Median 91,4 %). Die hemmende Wirkung von ENL in den Konzentrationen ≥ 5 µg/ml ($p < 0,001$) sowie END in der Konzentration 50 µg/ml ($p < 0,001$) und MATA ≥ 10 µg/ml waren signifikant stärker ausgeprägt ($p < 0,05$).

Tamoxifen reduzierte die Zellproliferation auf 0,7 % der Negativkontrolle. Der Einfluss war im Vergleich zu demjenigen aller anderen Test- und Kontrollsubstanzen signifikant stärker ausgeprägt ($p < 0,001$).

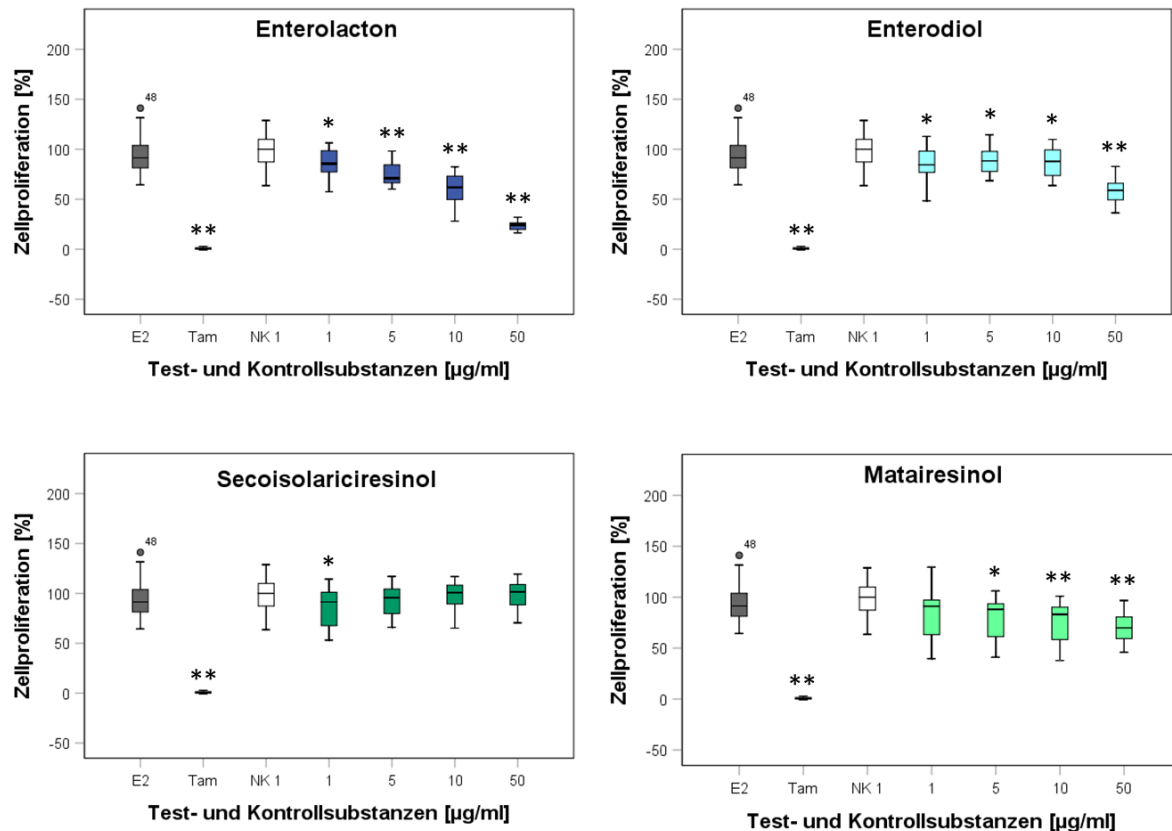


Abb. 23: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf die Proliferation der Zelllinie MCF-12A im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17β -Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [µg/ml]; $n = 5 \times 4$.

HMEC

Das BrdU-Assay der Primärkultur der HMEC wurde ebenfalls einmalig mit 4 Ansätzen ($n = 1 \times 4$) pro Test- und Kontrollsubstanz mit Zellen der 5. Passage durchgeführt.

Anders als bei den Zelllinien MCF-12A und Hs 578T wichen die Negativkontrolle 1 und 2 signifikant voneinander ab. Um einen möglichen antiproliferativen Einfluss des Lösungsmittels Ethanol auf die Primärkultur zu berücksichtigen diente bei dieser Zelllinie die Negativkontrolle 2 als Referenzwert (100 %). Verglichen mit der NK 2 führten die Lignane größtenteils zu einer leichten nicht-signifikanten Proliferationshemmung (Abb. 24). ENL in Konzentrationen ≥ 10 µg/ml zeigte die stärkste antiproliferative Wirkung (Median 85 %). Auch unter dem Einfluss von END in den Konzentrationen 5 µg/ml und 10 µg/ml, ≥ 10 µg/ml MATA und SECO in der Konzentration 50 µg/ml wurde die Zellproliferation um 10 % bis 15 % reduziert. Bei Zugabe von 1 µg/ml MATA kam es zu einer leichten Steigerung der Proliferation (Median 112 %). Keiner der Effekte war signifikant.

Tamoxifen zeigte eine große Spannweite der Ergebnisse mit einem Median von 108 %, 17 β -Estradiol von etwa 100 %, beide ohne signifikanten Unterschied zu den übrigen Substanzen.

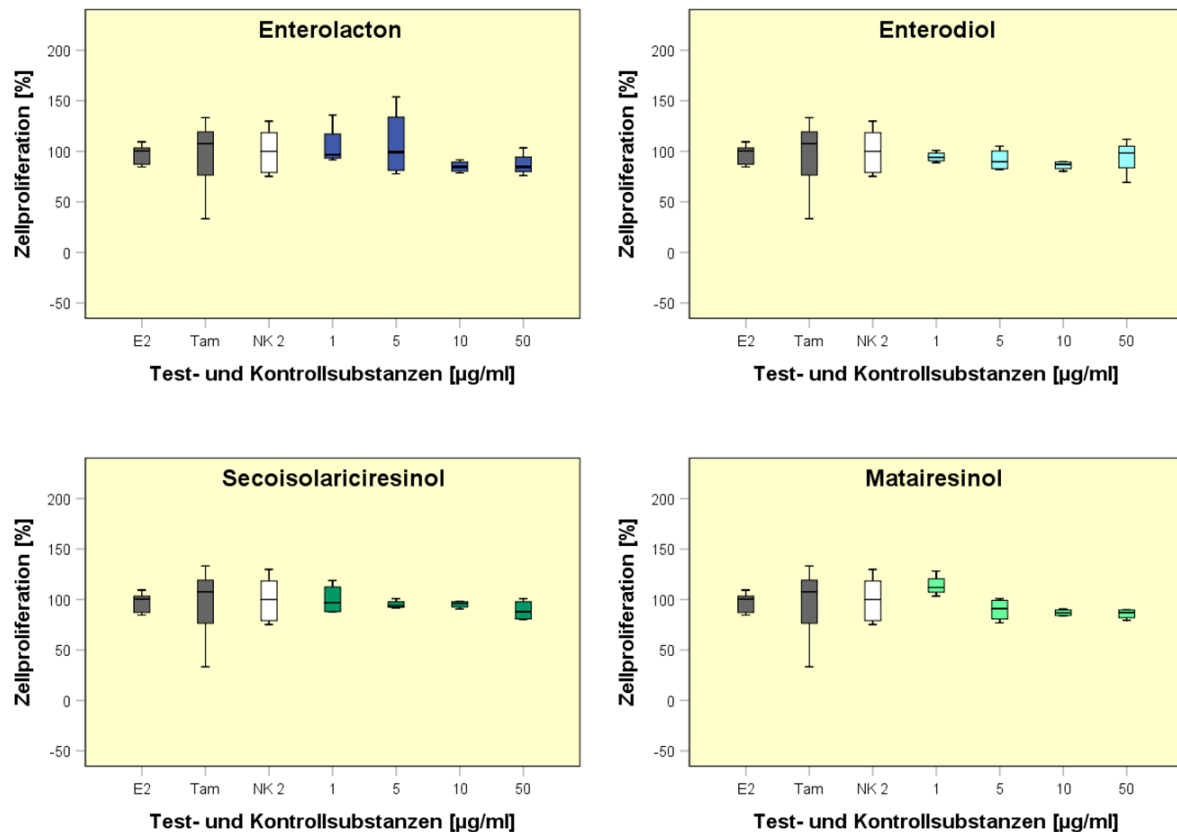


Abb. 24: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf die Proliferation der HMEC im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17 β -Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 2 = Medium + Zellen + Ethanol, 1–50 = Substanzkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]; n = 1 x 4.

Hs 578T

Hier wurde der Versuch 5 Mal mit jeweils 4 Ansätzen (n = 5 x 4) der Passagen 10 bis 16 durchgeführt.

Korrelierend zum LDH-Test der Linie Hs 578T waren die Werte einiger Messreihen durch größere Spannweiten oder Interquartilabstände gekennzeichnet.

Alle vier Lignane führten in Konzentrationen ≥ 5 $\mu\text{g/ml}$ zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Zellproliferationshemmung der Mammarkarzinom-Zelllinie Hs 578T, MATA auch in der Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ (Abb. 25). Wie auch bei der Zelllinie MCF-12A zeigte ENL den stärksten Effekt. Die Vermehrung der Zellen verringerte sich unter dem Einfluss der

höchsten Konzentration (50 µg/ml) auf etwa 32 % ($p < 0,001$) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (NK 1). In der gleichen Konzentration bewirkte END eine Reduktion der Proliferation auf circa 37 % ($p < 0,001$), MATA auf 55 % ($p < 0,001$) und SECO auf 67 % ($p < 0,001$). Mit abnehmender Konzentration der Lignane verringerte sich deren inhibitorische Wirkung und die Zellproliferation stieg bei allen Lignanen in der höchsten Verdünnungsstufe (1 µg/ml) auf 91–94 % der Negativkontrolle an.

17 β -Estradiol reduziert die Zellproliferation im Vergleich zur Negativkontrolle leicht und signifikant auf etwa 92 % ($p = 0,009$). Im Vergleich zum 17 β -Estradiol war die antiproliferative Wirkung aller vier Lignane in Konzentrationen > 5 µg/ml stärker ausgeprägt, bei ENL und MATA ≥ 10 µg/ml sowie bei END und SECO bei 50 µg/ml mit Signifikanz.

Im Vergleich zu Tamoxifen (Median 0,4 %) war der hemmende Einfluss aller anderen Test- und Kontrollsubstanzen signifikant geringer ($p < 0,001$).

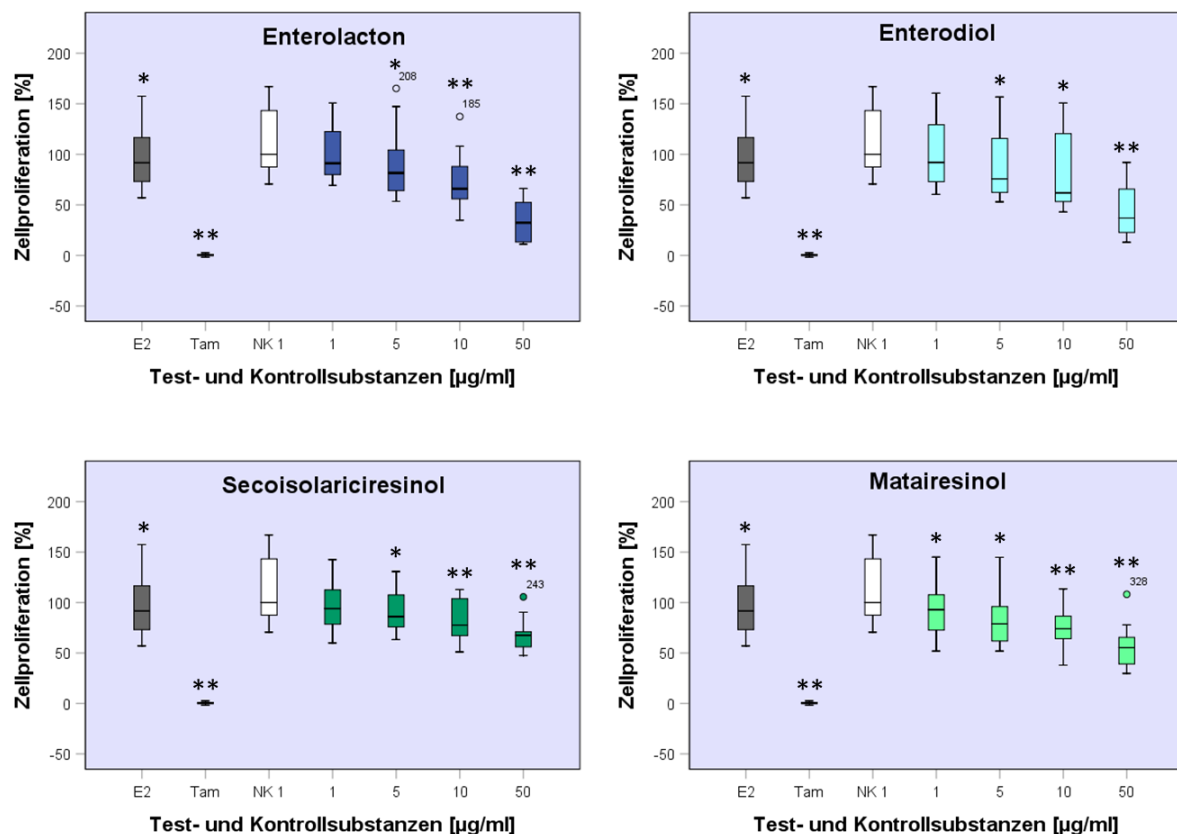


Abb. 25: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf die Proliferation der Zelllinie Hs 578T im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17 β -Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [µg/ml]; $n = 5 \times 4$.

4.4 OXIDATIVER STRESS UND ZELLMETABOLISMUS

4.4.1 OXIDATIVER STRESS

Als Marker für oxidativen Stress unter dem Einfluss der verschiedenen Test- und Kontrollsubstanzen wurde nach 24-stündiger Inkubation ein durch Wasserstoffperoxid umgesetzter Farbstoff photometrisch bestimmt und mit Hilfe einer Standardkurve die H_2O_2 -Menge sowie die H_2O_2 -Konzentration in den Proben berechnet.

MCF-12A

Die Messung erfolgte 3 Mal ($n = 3$) mit den Zellen der 26. bis 28. Passage.

Bei unbehandelten Zellen (NK 1) ließ sich im Mittel eine Konzentration von 0,0471 pmol/ μl Wasserstoffperoxid nachweisen. Der Einfluss der Lignane und Kontrollsubstanzen auf den oxidativen Stress der Zelllinie MCF-12A war insgesamt gering ($\pm 5\%$) ausgeprägt und zeigte keine Signifikanz (Abb. 26). Ein konzentrationsabhängiger Verlauf ließ sich nur unter ENL vermuten. Mit steigender Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 50 $\mu\text{g/ml}$ verringerte sich H_2O_2 -Konzentration in den Proben über 0,0491 pmol/ μl , 0,0483 pmol/ μl und 0,0457 pmol/ μl auf 0,0449 pmol/ μl . Unter 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 50 $\mu\text{g/ml}$ END (0,0459 pmol/ μl , 0,0459 pmol/ μl , 0,0458 pmol/ μl und 0,0467 pmol/ μl) und ≥ 5 $\mu\text{g/ml}$ MATA (0,0457 pmol/ μl , 0,0457 pmol/ μl und 0,0467 pmol/ μl), sowie unter 5 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ SECO (0,0467 pmol/ μl und 0,0463 pmol/ μl) lagen die H_2O_2 -Werte, bei einem eher undulierenden Verlauf, unterhalb der Negativkontrolle. Die Messwerte unter 1 $\mu\text{g/ml}$ MATA wichen stark voneinander ab. 17 β -Estradiol und Tamoxifen führten beide zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses (0,0491 pmol/ μl bzw. 0,0482 pmol/ μl H_2O_2).

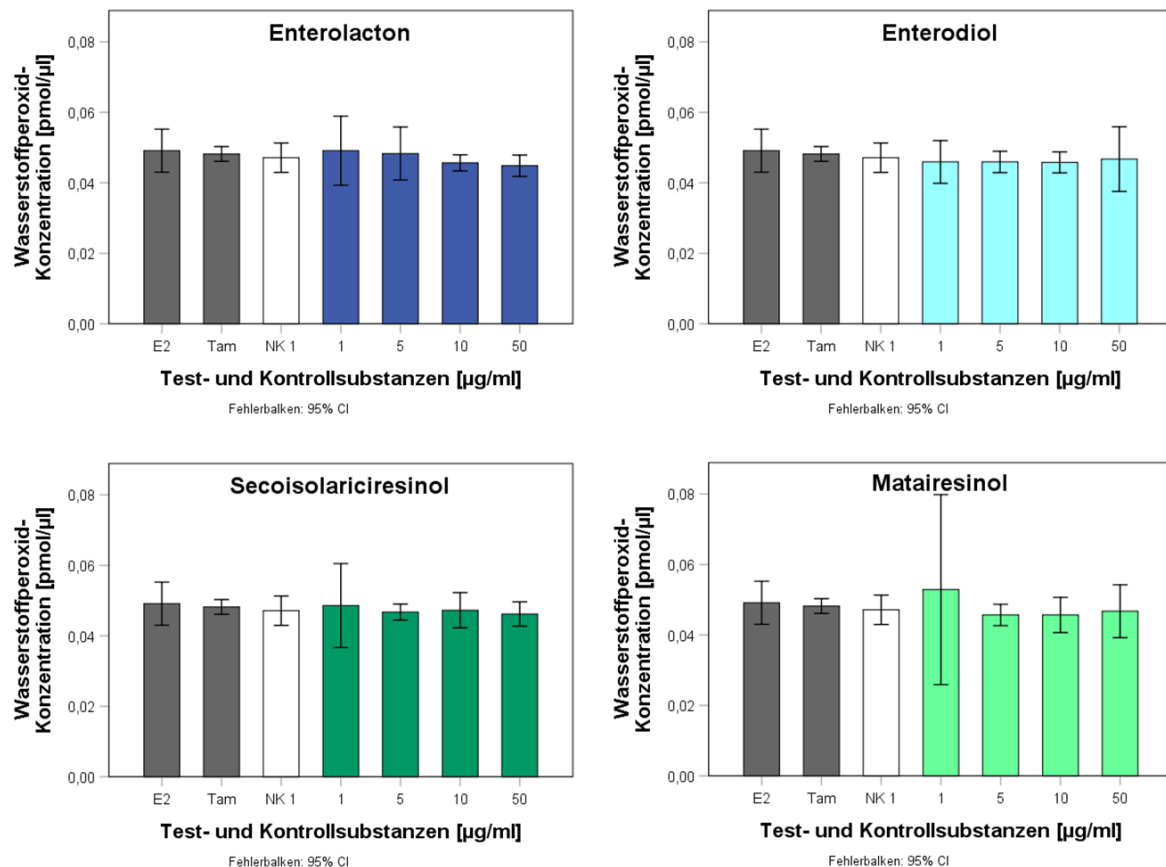


Abb. 26: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den oxidativen Stress der Zelllinie MCF-12A; E2 = 17β -Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]; n = 3.

HMEC

Die Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Konzentration erfolgte nur einmalig (n = 1) bei der 5. Passage.

Die H_2O_2 -Konzentrationen zeichneten sich bei den HMEC insgesamt durch deutlich niedrigere Werte als bei den anderen beiden Zelllinien und teilweise starke Veränderungen durch die Lignane aus (Abb. 27). Die H_2O_2 -Konzentration der NK 2 lag bei 0,0045 pmol/µl. Unter ENL-Einfluss zeigte sich andeutungsweise ein konzentrationsabhängiger Verlauf, unter 1 µg/ml bis 50 µg/ml ENL sank das H_2O_2 von einem deutlich erhöhten Wert (0,011 pmol/µl) in den Bereich der Negativkontrolle (0,0045 pmol/µl) ab. Die anderen drei Lignane führten zu einem weitestgehend undulierender Verlauf mit Abnahme der H_2O_2 -Konzentration um 18 % bei 50 µg/ml END (0,0038 pmol/µl) und um mehr als 100 % bis 600 % bei ≥ 5 µg/ml SECO

(0,0022 pmol/μl, 0,0007 pmol/μl und 0,0022 pmol/μl) und 1 μg/ml bzw. 50 μg/ml MATA (0 pmol/μl und 0,0022 pmol/μl) der Negativkontrolle.

Unter 17β-Estradiol stieg das Wasserstoffperoxid in den Proben um etwa 44 % auf 0,008 pmol/μl und unter Tamoxifen um etwa 30 % auf 0,0064 pmol/μl an.

Die Unterschiede zwischen der Negativkontrolle und den einzelnen Test- und Kontrollsubstanzen waren jedoch nicht signifikant.

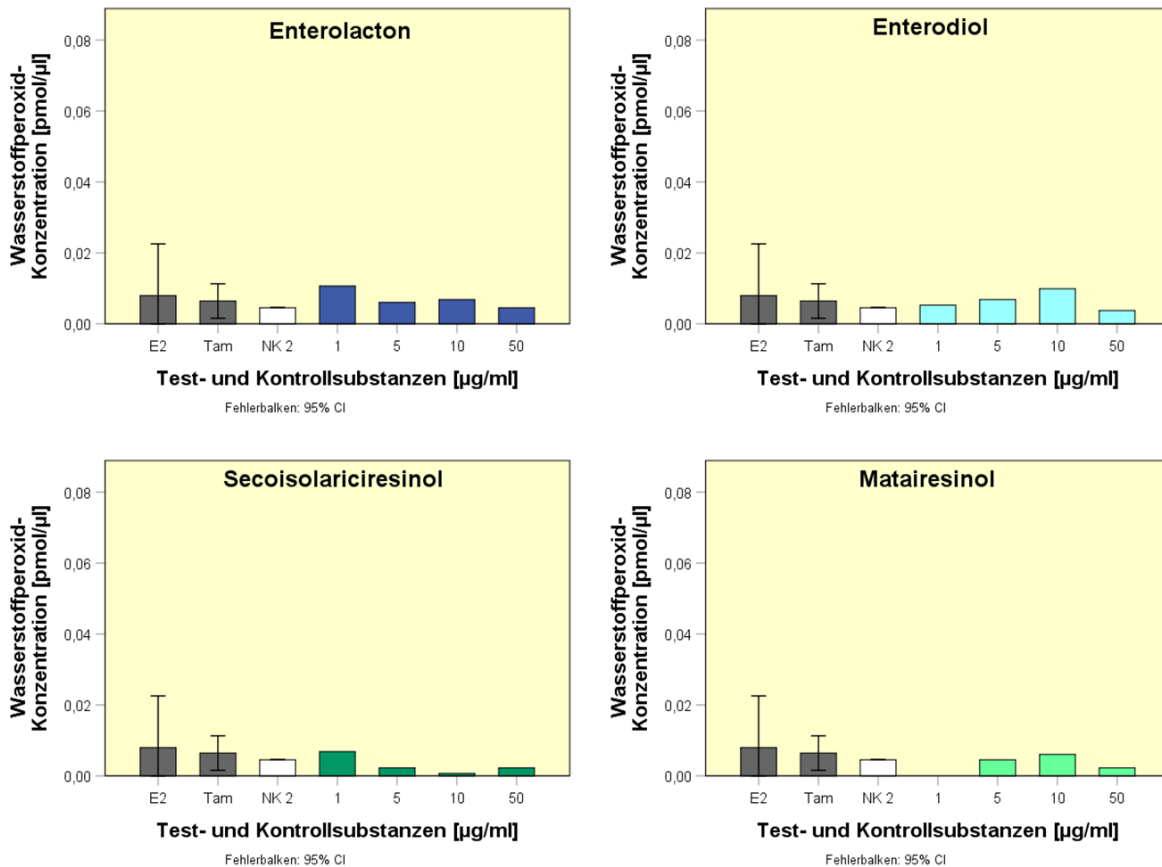


Abb. 27: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den oxidativen Stress der HMEC; E2 = 17β-Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 2 = Medium + Zellen + Ethanol, 1–50 = Substanzkonzentration [μg/ml]; n = 1.

Hs 578T

Die H₂O₂-Messung erfolgte nur einmalig (n = 1) bei der 14. Passage.

Die Wasserstoffperoxid-Konzentration der unbehandelten Zellen (NK 1) lag im Mittel bei 0,0529 pmol/μl. Der Einfluss der Lignane induzierte in den meisten Konzentrationen eine leichte Verringerung des oxidativen Stresses um 5 % bis 10 % (Abb. 28). Dabei zeigten sich

weitestgehend undulierende Verläufe des H_2O_2 , lediglich unter MATA ließ sich eine konzentrationsabhängige Reduktion darstellen. Die stärkste Wirkung übten 5 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ END sowie 50 $\mu\text{g/ml}$ SECO mit einem Abfall der H_2O_2 -Konzentration um ca. 14 % auf 0,0464 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ aus.

Unter Einfluss von 17β -Estradiol und Tamoxifen verringert sich die Konzentration von Wasserstoffperoxid auf im Mittel 0,0491 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ bzw. 0,0471 $\text{pmol}/\mu\text{l}$.

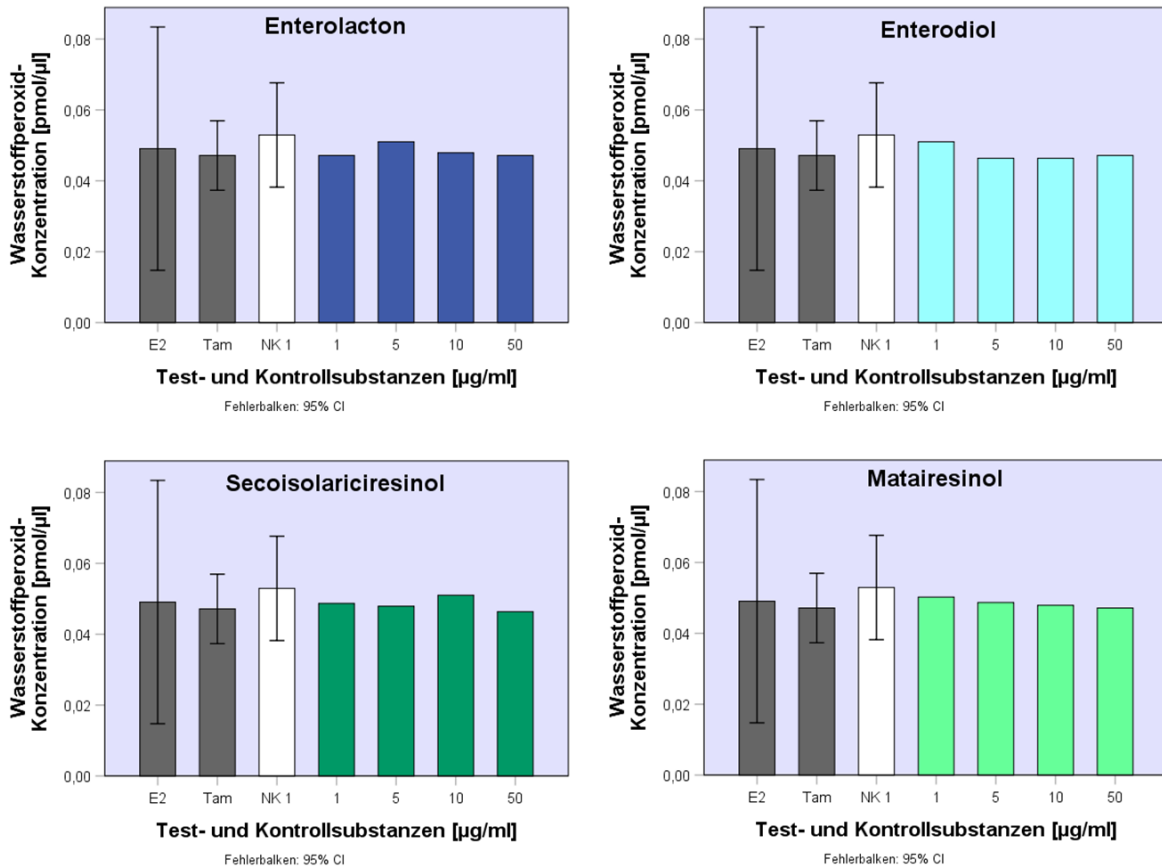


Abb. 28: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den oxidativen Stress der Zelllinie Hs 578T; E2 = 17β -Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]; n = 1.

4.4.2 GLUKOSEVERBRAUCH

Zur Beurteilung der Vitalität der Zellen wurde als wichtiger Marker für den Zellmetabolismus die Glukosekonzentration im Medium mittels elektrochemischem Messprinzip nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Substraten bestimmt. Über das Verhältnis zur Glukosekonzentration bei unbehandelten Zellen (NK) konnte der relative Glukoseverbrauch der Zellen berechnet werden.

MCF-12A

Die Messung erfolgte 3 Mal ($n = 3$) mit den Zellen der Passagen 26 bis 28.

Der Mittelwert der Glukosekonzentration des Mediums lag bei etwa 8,0 mmol/l. Bei der NK 1 zeigte sich ein Abfall um etwa 19 % auf ca. 6,7 mmol/l, was einem Glukoseverbrauch von 100 % gleichgesetzt wurde. Unter dem Einfluss der Lignane konnte im Vergleich zu unbehandelten Zellen größtenteils ein leicht erhöhter Glukoseverbrauch gemessen werden (Abb. 29). Die geringste Glukose-Aufnahme zeigte sich unter 1 µg/ml ENL (98 %) und 1 µg/ml SECO (97 %), der größte hingegen unter 50 µg/ml END (115 %) und ≥ 5 µg/ml MA-TA (115–118 %). Eine eindeutige konzentrationsabhängige Wirkung ließ sich bei keinem Lignan ableiten.

Der Glukoseverbrauch der Zellen unter 17 β -Estradiol lag im Bereich der Negativkontrolle (102 %), unter Tamoxifen war er reduziert (86 %). Keiner der Messreihen unterschied sich signifikant von der Kontrolle.

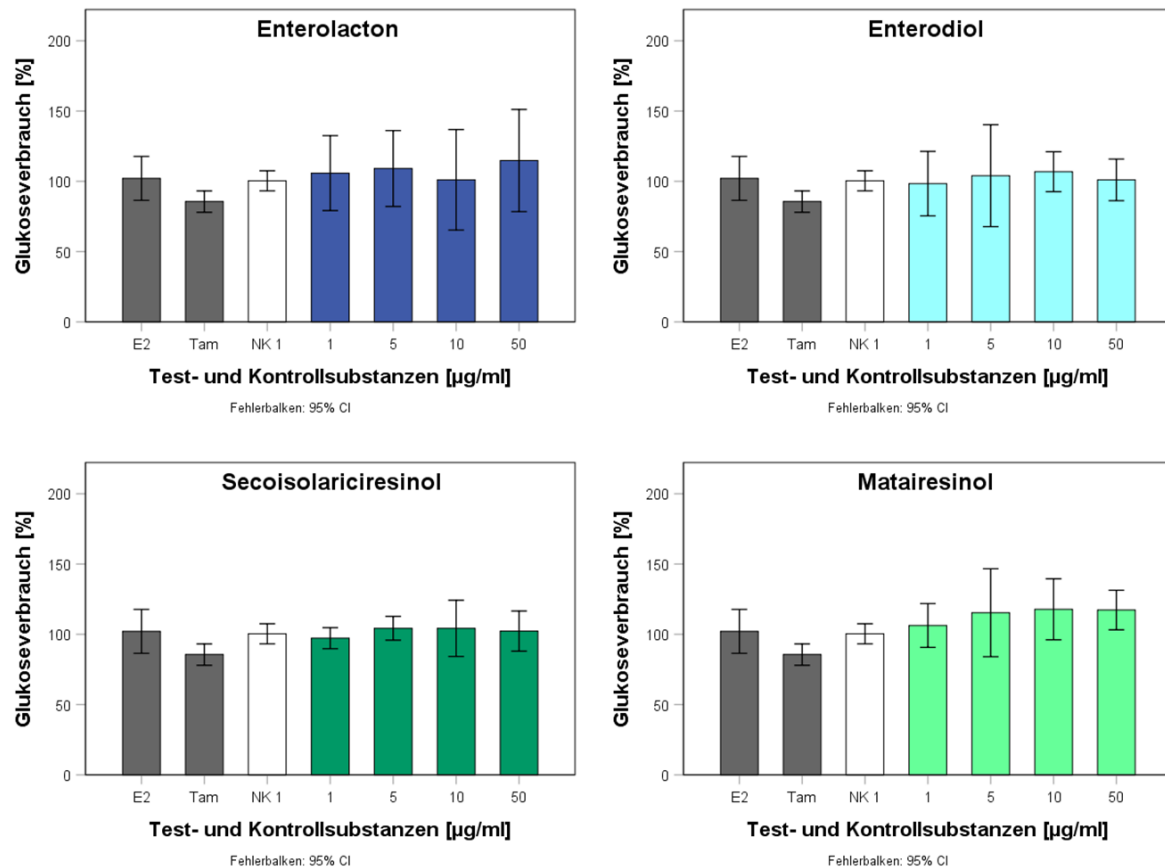


Abb. 29: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den Glukoseverbrauch der Zelllinie MCF-12A im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17 β -Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [µg/ml]; n = 3.

HMEC

Wie auch die Biochemischen Assays erfolgte die Bestimmung der Glukose-Konzentration einmalig (n = 1) mit der 5. Passage.

Die Glukosekonzentration im Medium betrug im Mittel 7,9 mmol/l. Bei der Negativkontrolle 2 verringert sie sich um etwa 13 % auf 7,0 mmol/l, zeigte aber eine hohe Standardabweichung. Letztere wurde einem Verbrauch von 100 % gleichgesetzt. Bei Zugabe der Lignane blieb die Glukoseaufnahme der Zellen im Bereich der Negativkontrolle (+/-5 %) und zeigte eher undulierende Verläufe (Abb. 30). Auch unter Einfluss von 17 β -Estradiol zeigte sich nahezu kein Effekt (Mittelwert 99 %). Bei Zugabe von Tamoxifen war die Glukoseaufnahme im Vergleich zur Negativkontrolle um fast 10 % geringer (Mittelwert 91 %).

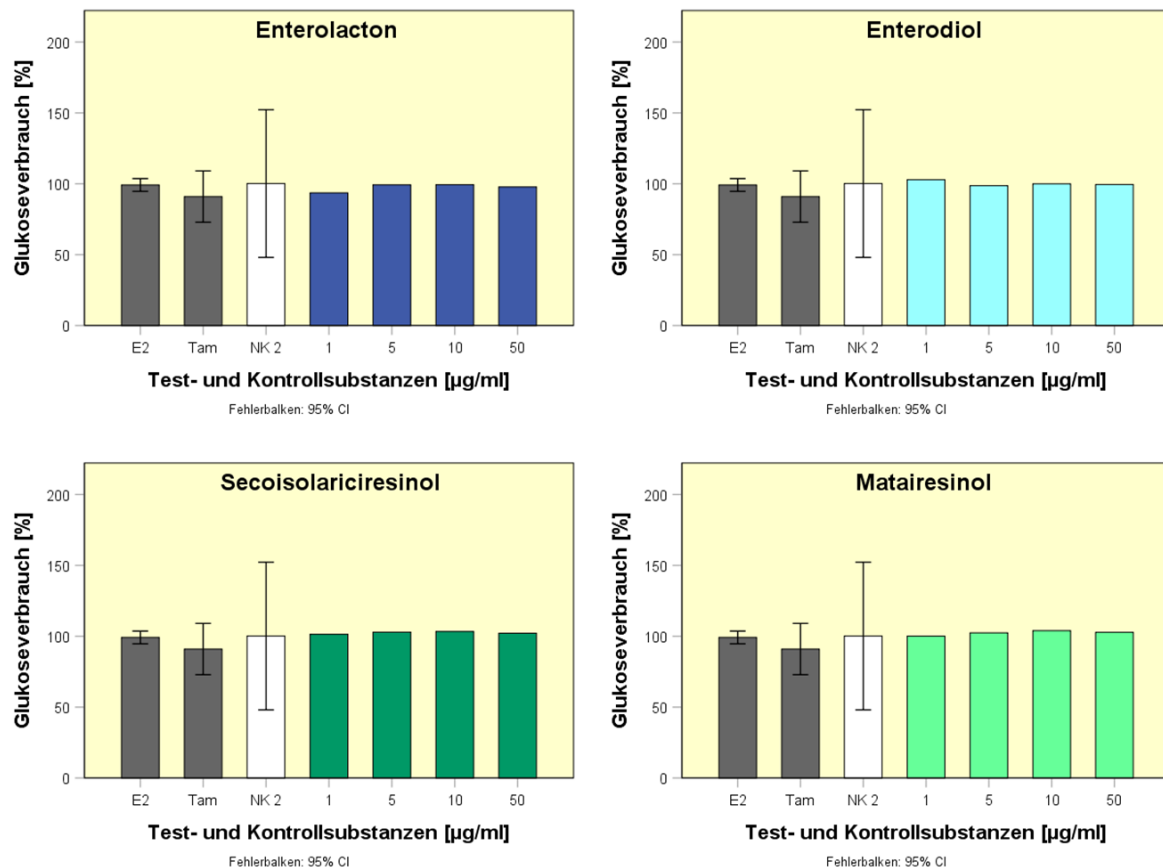


Abb. 30: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den Glukoseverbrauch der HMEC im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17β -Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 2 = Medium + Zellen + Ethanol, 1–50 = Substanzkonzentration [μ g/ml]; n = 3.

Hs 578T

Die Bestimmung der Glukosekonzentrationen erfolgte drei Mal (n = 3). Hierzu wurden die Passagen 17–21 verwendet.

Die Glukosekonzentration im Medium lag bei etwa 22,7 mmol/l und nahm bei der NK 1 um etwa 14 % auf ca. 20 mmol/l ab. Die Negativkontrolle wurde hier ebenfalls einem Verbrauch von 100 % gleichgesetzt. Der Glukoseverbrauch der Zellen unter Einfluss der Lignane und des 17β -Estradiols lag ebenfalls größtenteils nahe der Negativkontrolle (+/-5 %) (Abb. 31). Der geringste Glukoseverbrauch zeigte sich unter 50 μ g/ml ENL (Mittelwert 95 %), der größte unter 1 μ g/ml END (Mittelwert 107 %) und 1 bzw. 5 μ g/ml SECO (Mittelwert 106 % bzw. 109 %, p = 0,024). Der Effekt von ENL und END zeigte andeutungsweise einen konzentrationsabhängigen Verlauf mit einer Abnahme des Glukoseverbrauches bei steigender Konzentration.

Unter dem Einfluss von Tamoxifen zeigten die Zellen eine um fast 10 % reduzierte Aufnahme von Glukose (Mittelwert 91 %), die sich signifikant ($p < 0,05$) von einem Großteil der Test- und Kontrollsubstanzen (außer 1 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ ENL) unterschied.

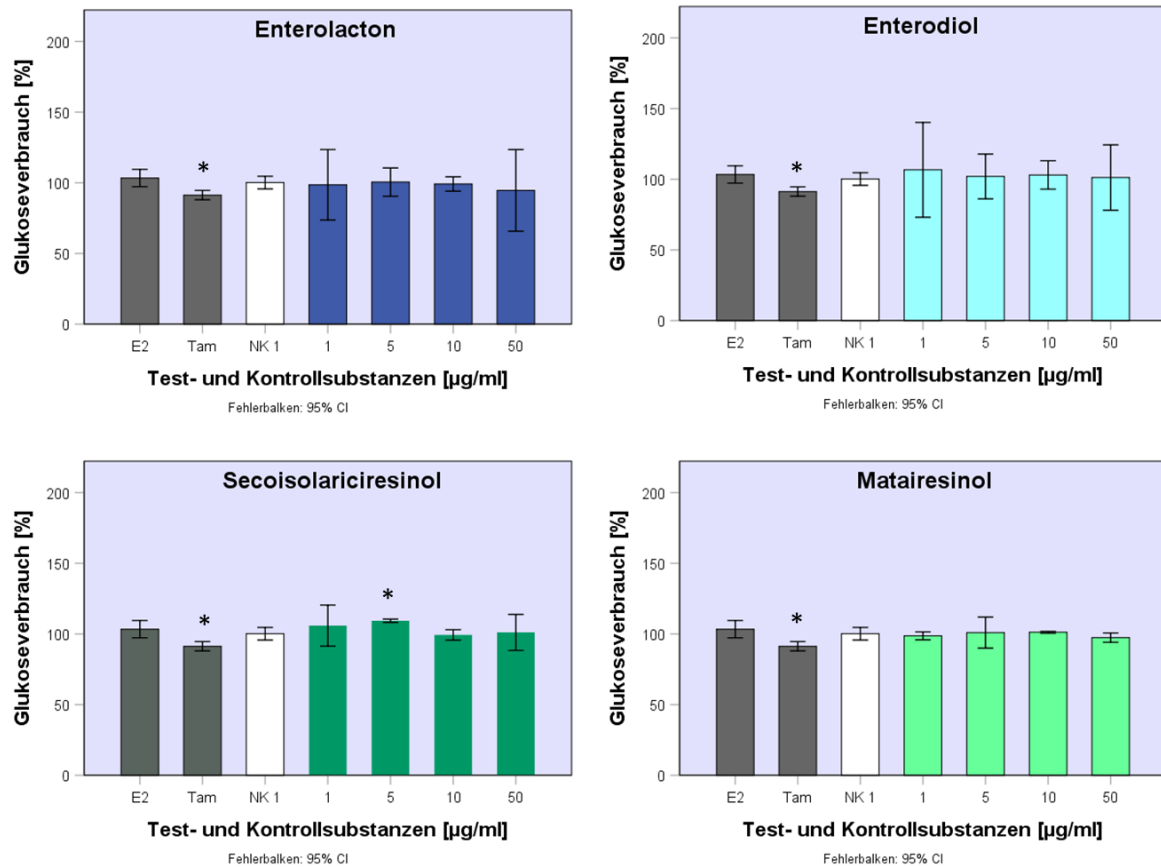


Abb. 31: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den Glukoseverbrauch der Zelllinie Hs 578T im Vergleich zur Negativkontrolle; E2 = 17β -Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]; $n = 3$.

4.4.3 PH-WERT

Die pH-Wert-Bestimmung im zellfreien Überstand diente ebenfalls der Beurteilung der metabolischen Aktivität der Zellen. Die Messung beruht auf einer H^+ -Ionen abhängigen Potenzialdifferenz zwischen zwei Bezugs-Elektroden, die sich proportional zum pH-Wert verhält.

MCF-12A

Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte 4 Mal ($n = 4$) bei Zellen der 26. bis 40. Passage.

Der Mittelwert des pH-Wertes vom Medium lag bei 7,47, was näherungsweise dem physiologischen pH des Plasmas im menschlichen Organismus entspricht (Normwert 7,35–7,45) [101]. Bei der NK 1 sank er erwartungsgemäß durch die bei der Zellproliferation und im Zellmetabolismus anfallenden sauren Stoffwechselprodukte ab (Mittelwert 7,37). Der Einfluss von 17β -Estradiol ordnete sich ebenfalls in diesem Bereich ein (Mittelwert 7,35), unter Tamoxifen änderte sich der pH-Wert kaum (Mittelwert 7,43). Auch hier zeigten die Lignane einen sehr geringen Einfluss ($\pm 1\%$), die Messreihen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 32). Bei Zugabe der Lignane lagen die meisten pH-Werte etwas niedriger als derjenige der NK 1. Ein konzentrationsabhängiger Effekt ließ sich bei ENL und MATA vermuten. Der pH sank von 7,4 bei 1 $\mu\text{g/ml}$ auf 7,33 bei 50 $\mu\text{g/ml}$ ENL ab. Bei MATA zeigte sich ein Abfall von 7,34 bei 1 $\mu\text{g/ml}$ auf 7,30 bei 50 $\mu\text{g/ml}$. END und SECO führten zu einem undulierenden Verlauf mit Mittelwerten zwischen 7,35 und 7,36.

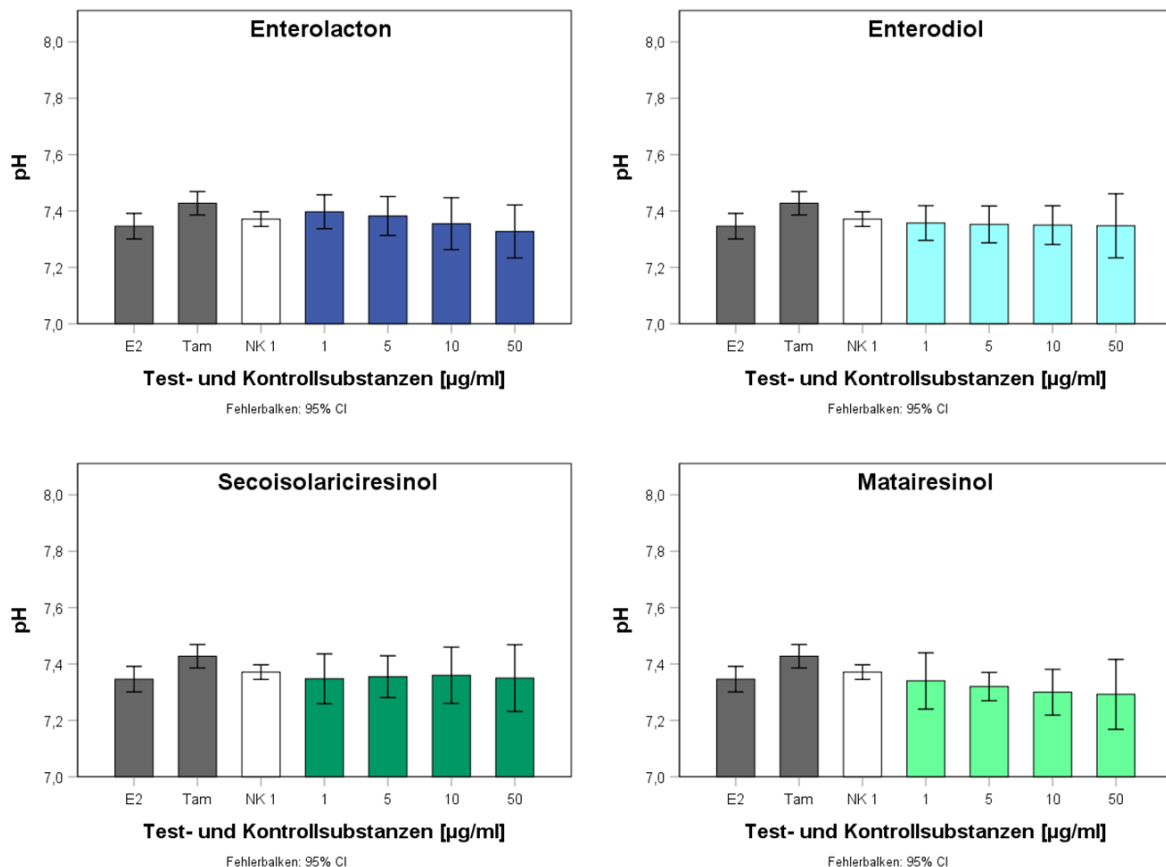


Abb. 32: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den pH-Wert im Überstand der Linie MCF-12A; E2 = 17 β -Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [μ g/ml]; n = 4.

HMEC

Der pH-Wert wurde einmalig (n = 1) bei der 5. Passage bestimmt.

Der pH-Wert des Mediums betrug im Mittel 7,77 und sank bei der NK 2 auf etwa 7,66 ab.

Unter Einfluss der Lignane änderte sich der pH-Wert im Vergleich zu Negativkontrolle kaum (+/-1 %) (Abb. 33). ENL und END reduzierten den pH-Wert am stärksten mit einem Minimum von 7,6 bei 10 μ g/ml END und von 7,62 bei 5 μ g/ml ENL. Bei MATA zeigte sich ein undulierender Verlauf mit fallendem pH bei 5 μ g/ml und 10 μ g/ml (7,63) und steigendem pH bei 1 μ g/ml (7,66) und 50 μ g/ml (7,68). Unter SECO verhielt es sich umgekehrt mit einem höherem pH bei 5 μ g/ml und 10 μ g/ml (7,69 und 7,69) und niedrigerem pH bei 1 μ g/ml und 50 μ g/ml (7,66 bzw. 7,67).

Unter dem Einfluss von Tamoxifen stieg der pH im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls leicht an (Mittelwert 7,7), unter 17 β -Estradiol sank er minimal ab (Mittelwert 7,65).

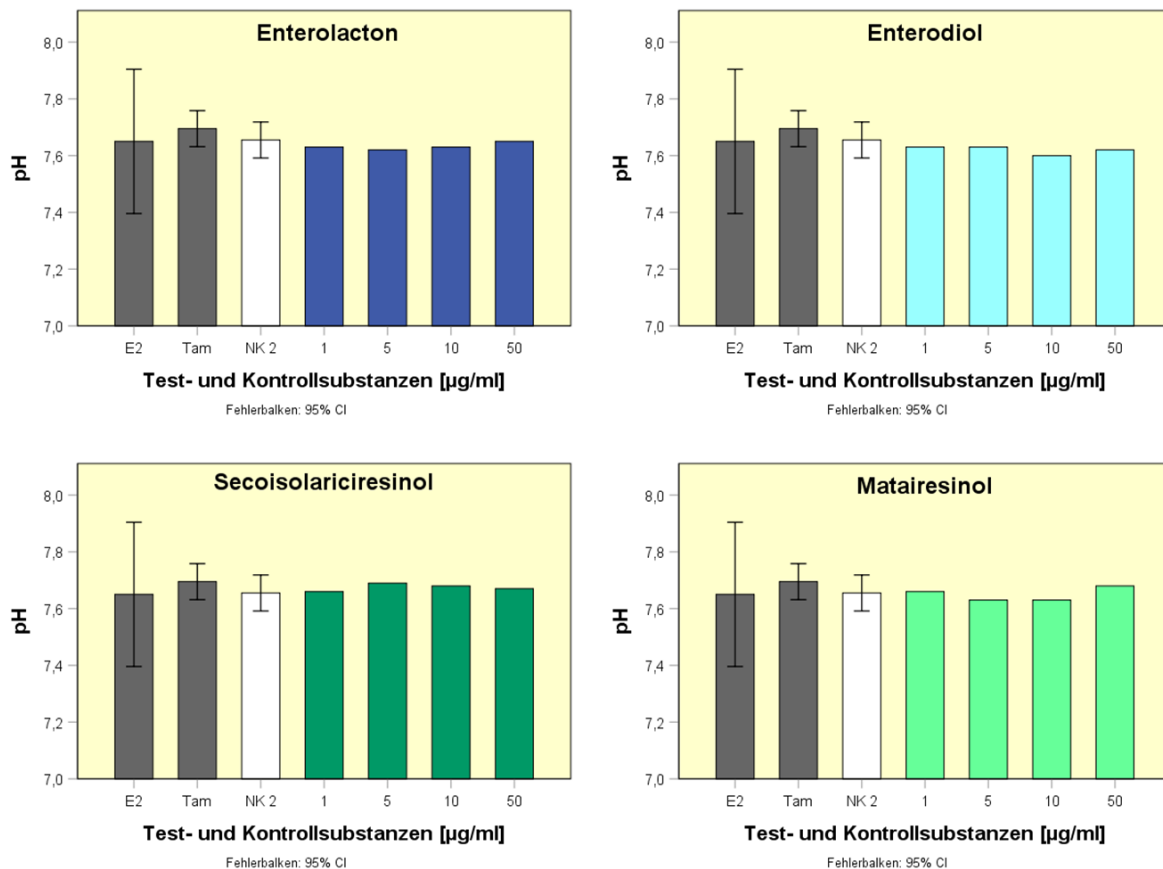


Abb. 33: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den pH-Wert im Überstand der HMEC; E2 = 17β -Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 2 = Medium + Zellen + Ethanol, 1–50 = Substanzkonzentration [μ g/ml]; n = 1.

Hs 578T

Die pH-Wert-Bestimmung wurde 3 Mal (n = 3) bei den Passagen 17 bis 21 durchgeführt.

Der pH-Wert des Mediums lag bei etwa 8,48. Unter dem Einfluss von Tamoxifen veränderte er sich kaum (Mittelwert 8,5). Bei der Negativkontrolle 1 ohne Substrate (Mittelwert 8,43) und unter 17β -Estradiol (Mittelwert 8,38) sank er leicht ab. ENL und END zeigten eine geringe, möglicherweise konzentrationsabhängige Wirkung, mit steigendem pH von 8,43 bis 8,46 unter 1 μ g/ml bis 50 μ g/ml ENL und von 8,41 bis 8,42 unter 1 μ g/ml bis 50 μ g/ml END. SECO und MATA induzierten einen etwas stärkeren Effekt und einen undulierenden Verlauf, der pH fiel auf ein Minimum von 8,36 bei 10 μ g/ml SECO und auf 8,37 bei 10 μ g/ml MATA ab (Abb. 34). Keiner der Unterschiede war signifikant.

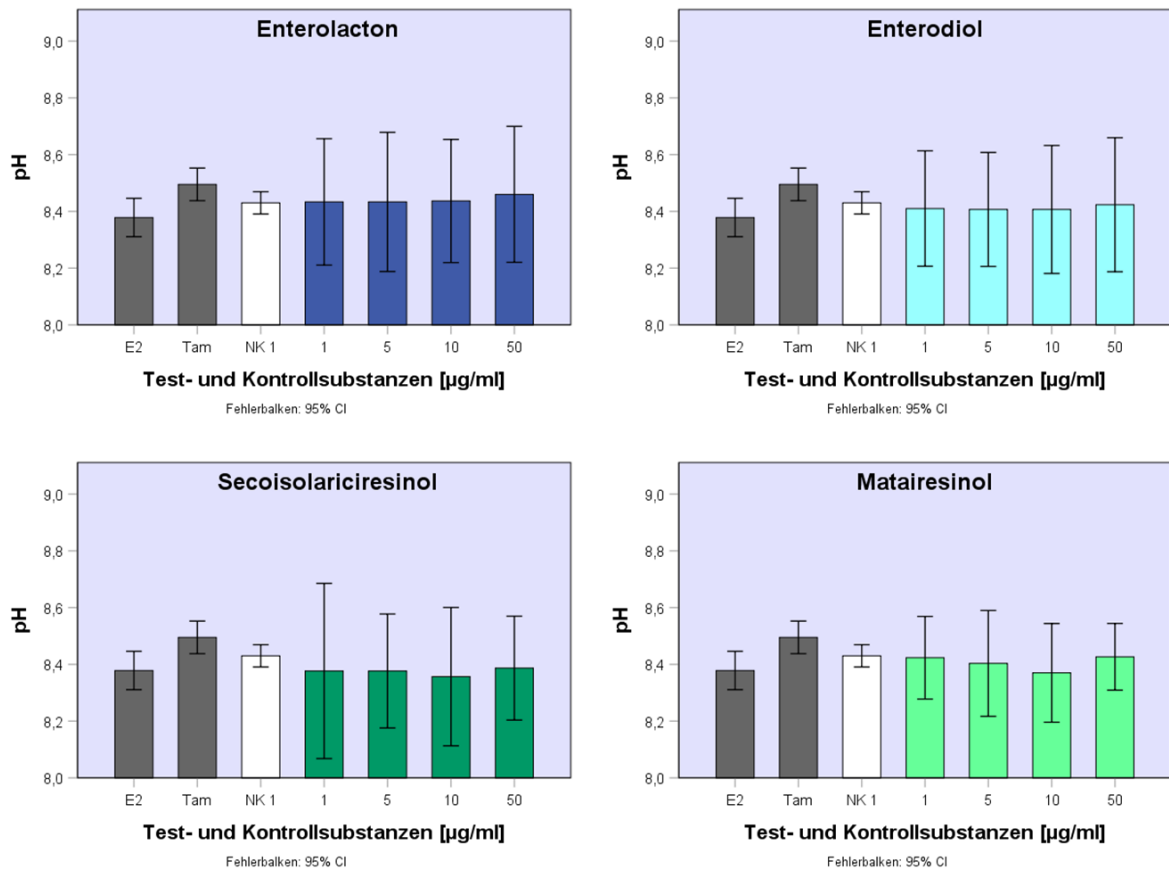


Abb. 34: Einfluss der Test- und Kontrollsubstanzen auf den pH-Wert im Überstand der Linie Hs 578T; E2 = 17 β -Estradiol (1×10^{-9} mol/l), Tam = Tamoxifen (1×10^{-4} mol/l), NK 1 = Medium + Zellen, 1–50 = Substanzkonzentration [µg/ml]; n = 3.

V. DISKUSSION

Lebensstil und Ernährungsgewohnheiten sind aufgrund der weltweit erheblichen geographischen Unterschiede in der Inzidenz und Mortalität des Mammakarzinoms in den Fokus zahlreicher Forschungsgruppen gerückt. Insbesondere den Phytoestrogenen aus Soja wird ein entscheidender Einfluss auf das vergleichsweise niedrige Brustkrebsrisiko in asiatischen Ländern beigemessen. Den größten Anteil an Phytoestrogenen in der westlichen Ernährungsweise machen Lignane aus. Hauptquelle hierfür sind Leinsamen. Die Leinpflanze ist in unseren Breitengraden heimisch und gut kultivierbar, sie stellt also theoretisch eine Art Pendant zur Isoflavon-reichen Sojapflanze dar.

Der Einfluss von Lignanen auf Brustkrebszellen sowie deren möglichen Nutzen für die Prävention und Therapie dieser Erkrankung wird daher unter anderem vom Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock seit Jahren untersucht [70, 73, 78, 201, 255, 266, 277, 290]. Mit Extrakten aus verschiedenen Pflanzenteilen bzw. mit unterschiedlichen Altersstufen und Extraktionsmethoden der Leinpflanze *Linum usitatissimum* wurden *in-vitro*-Versuche an benignen [290] und malignen [70, 73, 78, 201, 255, 266, 277, 290] Zellen der Mamma durchgeführt. Insgesamt zeigten sich in den meisten Arbeiten unabhängig vom Hormonrezeptorstatus vor allem bei hohen Extraktkonzentrationen antiproliferative und zytotoxische Effekte auf Mammakarzinomzellen [70, 201, 255, 266, 277, 290]. Bei niedrigen Extraktkonzentrationen oder ER-positiven Zellen konnten jedoch zum Teil auch proliferative Wirkungen beobachtet werden [70, 277, 290]. Die bisherigen Ergebnisse sind auf wenige Zellreihen und einzelne Lignane bzw. Extrakt-Gemische begrenzt und lassen keine finale Beurteilung zu.

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden welchen Einfluss verschiedene isolierte Lignane auf unterschiedlich veränderte Mamma- und Mammakarzinomzellen ausüben. Gleichzeitig sollte die Wirkung in Abhängigkeit der Expression von Estrogenrezeptoren durch die verschiedenen Zellen betrachtet werden. Das übergeordnete Ziel dahinter ist, die bisherige Studienlage um Erkenntnisse zu erweitern, um in Zukunft Leinsamen oder auch einzelne Lignane präventiv oder therapeutisch für das Mammakarzinom generell bzw. spezifische Typen dieses vielseitigen Karzinoms einsetzen zu können.

Hierzu wählten wir zwei in der Nahrung häufig vorkommende pflanzliche Lignane Secoisolariciresinol und Matairesinol sowie die beiden Säuger-Lignane Enterolacton und Enterodiol aus. Diese wurden *in-vitro* zum einen auf eine gutartig veränderte Mammazelllinie (MCF-12A), unveränderte primäre Zellen der Mamma (HMEC) und eine maligne Zelllinie eines Mammakarzinoms (Hs 578T) mit unterschiedlicher Hormonrezeptor-Expression gege-

ben. Dabei wurde die Wirkung der Lignane anhand dessen Einfluss auf die Zellproliferation, Zytotoxizität und oxidativen Stress sowie anhand verschiedener Stoffwechselfparameter untersucht und untereinander sowie mit der Wirkung des natürlichen Estrogens 17 β -Estradiol und des SERMs Tamoxifen verglichen. Die Ergebnisse werden im Folgenden zusammengefasst und im Zusammenhang mit der aktuellen Literatur diskutiert, neue Aspekte angerissen sowie mögliche Ursachen für Fehler und Widersprüche herausgearbeitet.

5.1 IMMUNHISTOCHEMIE

Der Hormonrezeptorstatus eines Mammakarzinoms hat in der Klinik eine entscheidende Bedeutung für dessen Therapiekonzept und die Prognose. Die Expression von Estrogenrezeptoren bietet die Möglichkeit einer antihormonellen Therapie [68] und ist verglichen mit den Hormonrezeptor-negativen Mammakarzinomen weitestgehend unabhängig von anderen demographischen oder tumorspezifischen Charakteristika mit einer geringeren Mortalität assoziiert [72].

Da die Expression der Estrogen- und Progesteronrezeptoren eine entscheidende Grundlage für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit darstellt wurden die drei Zelllinien mit Hilfe der immunhistochemischen Untersuchung erneut auf die Expression der Estrogenrezeptoren α und β sowie des Progesteronrezeptors überprüft.

Die Zelllinie MCF-12A und die Primärkultur der HMEC wiesen den von der Zellbank ausgewiesenen positiven Estrogen- und Progesteronrezeptorstatus auf. Bei der malignen Zelllinie Hs 578T blieb wie zu erwarten die immunhistochemische Färbung des ER α und des PR aus. Beim Nachweis des ER β hingegen zeigte sich eine starke rote Farbreaktion. Da auch anderen Studien [123, 238, 299] einen positiven immunhistochemischen Nachweis des Rezeptors bei der Linie Hs 578T beschrieben, wurde bei der Interpretation der Ergebnisse in dieser Arbeit entgegen der Ausschreibung der Zellbank der ATCC von einer Expression des ER β ausgegangen. Interessanterweise werden Tumoren dieses Zelltyps in der klinischen Diagnostik im Rahmen der molekularen Charakterisierung aufgrund der fehlenden Expression der α -Isoform des Estrogenrezeptors sowie negativem Progesteron- und HER2-Status den triple negativen Mammakarzinomen zugeordnet [150].

5.2 EINFLUSS DER LIGNANE AUF ZYTOTOXIZITÄT, ZELLPROLIFERATION, OXIDATIVEN STRESS UND ZELLSTOFFWECHSEL *IN-VITRO*

Zahlreiche Studien beschäftigten sich mit der Wirkung von lignanhaltigen Extrakten der Leinpflanze auf hormonabhängige Tumore [70, 89, 108, 201, 255, 266, 277, 290]. Unter dem Einfluss von hohen Extrakt-Konzentrationen konnten sowohl auf Hormonrezeptor-positive als auch -negative Mammakarzinomzellen antitumorigene Effekte des Leins festgestellt werden, bei niedrigen Extraktkonzentrationen zum Teil jedoch auch gegenteilige [70, 89, 201, 255, 266, 277, 290].

Pflanzenextrakte stellen ein Vielstoffgemisch aus zahlreichen unterschiedlichen Substanzen dar. In Wurzel-Extrakten der Leinpflanze *Linum usitatissimum* konnten beispielsweise Lipide, Kohlenhydrate, Isoprenoide sowie Polyphenole und je nach Extraktionsmethode (z. B. nach Luyengi *et al.*) in methanolischen Extrakten etwa 1,9–2,4 % Lignane nachgewiesen werden. Etwa 17,8–22,8 % dieser Extrakte stellten freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren dar [73, 266]. In Leinsamen sind etwa 3–3,8 mg/g Lignane (entspricht 0,3–0,38 %), vorwiegend SDG, und mehr als 30 % Fette [20, 30] enthalten [178, 269]. Mit einem Anteil von etwa 50 % der freien Fettsäuren ist in Leinsamen bzw. dessen Öl die α -Linolensäure (ALA) zu finden [20, 30, 223]. Diese mehrfach ungesättigte Ω -3-Fettsäure konnte in einigen Studien sowohl bei Hormonrezeptor-positiven als auch -negativen Mammakarzinomzellen *in-vitro* die Proliferation hemmen und Apoptose induzieren [133, 291] sowie *in-vivo* in Ratten und Mäusen bei ALA-angereicherter Diät die Inzidenz und das Wachstum von induzierten Mammakarzinomen senken [125, 165, 279]. Nach einem Review von Liu *et al.* haben auch zahlreiche epidemiologische Studien vielversprechende antitumorigene Effekte von Ω -3-Fettsäuren gezeigt [159].

Um den Anteil der Lignan-Wirkung unabhängig von weiteren Komponenten zu beurteilen wurde in dieser Arbeit der Einfluss einzelner Lignane auf Mamma- und Mammakarzinomzellen genauer untersucht.

5.2.1 ZYTOTOXISCHE WIRKUNG DER LIGNANE *IN-VITRO*

Auf die benigne Zelllinie MCF-12A und die Primärkultur der HMEC zeigte keines der vier Lignane in den verwendeten Konzentrationen eine signifikante zytotoxische Wirkung. Vor allem bei der Zelllinie MCF-12A traten eher gegenteilige Effekte auf.

Auf die ER α -negative und ER β -positive Zelllinie Hs 578T dagegen wirkten die Lignane, ausgenommen von Enterodiol, zytotoxisch, unterschieden sich aber nur bei 1 μ g/ml Matairesinol (Median 33 %) signifikant von der Negativkontrolle. Enterodiol zeigte mit steigender Konzent-

ration eine Verringerung der zytotoxischen Wirkung im Vergleich zur Negativkontrolle (-6,2 % bis -45,7 %), die bei den Konzentrationen 5 µg/ml und 10 µg/ml signifikant war. Unter dem Einfluss der übrigen Lignane zeigte sich ein eher undulierender Verlauf.

Die Studienlage der Wirkung von isolierten Lignane ist bisher begrenzt. Theil *et al.* konnten im Jahr 2011 eine geringe (< 5 %) zytotoxische Wirkung von Secoisolariciresinol bei der ER- und PR-positiven Zelllinie MCF-7 bei 50 µg/ml und bei der ER- und PR-negativen Zelllinie Linie BT20 bei 5 µg/ml feststellen [266]. Dass Lignane auf Estrogenrezeptor-negative Zellen signifikant zellschädigend wirken können wird ER-unabhängigen Mechanismen zugeschrieben (siehe Kapitel 1.5.1.4). Bei der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien muss als zweiter ursächlicher Punkt der ERβ diskutiert werden (siehe Kapitel 5.5).

5.2.2 EINFLUSS DER LIGNANE AUF DIE ZELLPROLIFERATION *IN-VITRO*

In absteigender Reihenfolge zeigten Enterolacton, Enterodiol und Matairesinol konzentrationsabhängig deutliche signifikant antiproliferative Effekte auf die Hormonrezeptor-positive Zelllinie MCF-12A. Unter dem Einfluss von Secoisolariciresinol kam es nur bei einer Konzentration von 1 µg/ml zu einer leichten signifikanten Hemmung der Zellproliferation. In vorangegangenen Studien konnte bei Versuchen mit Leinwurzel-Extrakten und anderen lignanhaltigen Pflanzenextrakten wie der Petersilienwurzel eine Hemmung der DNA-Synthese durch Lignane auch bei gutartigen Zellen der Mamma (MCF-10A, HMEC, MCF-12A) gezeigt werden [237, 290]. Für einzelne Lignane gibt es zu diesem Aspekt bisher kaum Untersuchungen. Unter dem Einfluss des isolierten Lignans Pinoresinol kam es bei der ER-negativen benignen Mammaepithelzelllinie MCF-10A zu einer signifikanten Zellproliferationshemmung bei Konzentrationen zwischen 0,01 und 10 µM, während es bei 100 µM zu einer deutlichen Proliferationssteigerung kam [161].

Auf die maligne Zelllinie Hs 578T zeigten alle vier Lignane in der gleichen Reihenfolge mit steigender Konzentration eine signifikante Reduktion der Zellproliferation, die teilweise stärker ausgeprägt war als bei der Zelllinie MCF-12A, jedoch auch eine größere Spannweite aufwies. Auch hier sind als Ursache möglicherweise ER-unabhängigen Mechanismen (siehe Kapitel 1.5.1.4) und / oder die isolierte Expression des ERβ (siehe Kapitel 5.5) von Bedeutung.

Die starke proliferationshemmende Wirkung der Enterolignane auf Mammakarzinomzellen bestätigt die bisherigen Erkenntnisse aus der Literatur [1, 266, 284]. Abarzua *et al.* wiesen im BrdU-Test ebenfalls eine deutlich stärkere Inhibition des Zellwachstums durch die Lignane

Enterolacton und Enterodiol als durch deren pflanzliche Vorläufer Secosolariciresinol und Matairesinol bei der ER-positiven malignen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 sowie der ER-negativen bösartigen Mammazelllinie BT-20 nach [1]. Auch die Konzentrationsabhängigkeit der Lignanwirkung dieser Arbeit findet sich in der Literatur wieder [1, 284]. Insbesondere hohe Enterolignan-Konzentrationen > 50–100 µM zeigten bei der Zelllinie MCF-7 sowie den ER-negativen Linien BT-20 und MDA-MB-231 eine Inhibition der Zellteilung, während niedrigere Konzentrationen bei der ER-positiven Zelllinie MCF-7 teilweise proliferationssteigernde Effekte auslösten [1, 284]. In meiner Arbeit konnten die „biphasischen Effekte“ [284] der Lignane bei Hormonrezeptor-positiven Zellen jedoch nicht bestätigt werden.

Unser Ergebnis, dass Lignane auf Brustkrebs-Zellen zwar nicht zytotoxisch, aber deutlich proliferationshemmend wirken, korreliert mit den Beobachtungen anderer Arbeiten an den Zelllinien MCF-7 und BT-20 [266]. Theil beobachtete *in-vitro* unter 10 µg/ml und 50 µg/ml Secosolariciresinol eine signifikante Suppression der Proliferation von MCF-7-Zellen auf 76 % bzw. 68 % im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei BT-20-Zellen war die Reduktion der Proliferation auf etwa 91 % unter 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml und auf 73 % unter 50 µg/ml signifikant. Die Zytotoxizität lag dabei stets unter 5 %. Dies sei möglicherweise auf eine Beeinflussung verschiedener Mechanismen der DNA-Synthese zurückzuführen [266].

Im Gegensatz zu meiner Arbeit war bei Abarzua *et al.* und Theil jedoch die Proliferationshemmung bei den ER-negativen Zellen geringer ausgeprägt als bei Hormonrezeptor-positiven [1, 266]. Eine Proliferationssteigerung konnte von Theil bei niedrigen Konzentrationen aber ebenfalls nicht beobachtet werden [266].

Der Einfluss der Lignane auf die Proliferation der Primärkultur der HMEC war insgesamt deutlich geringer ausgeprägt als bei der benignen und malignen immortalisierten Zelllinie. Den größten Effekt zeigte ebenfalls Enterolacton mit einer leichten nicht-signifikanten Hemmung um 16 % im Vergleich zur Negativkontrolle. Die anderen Lignane zeigten in höheren Konzentrationen ebenfalls antiproliferative Effekte zwischen 10 % und 15 %. Bei Matairesinol in der geringsten Konzentration kam es dagegen zu einer leichten, nicht-signifikanten Zunahme der Zellproliferation. Zum Vergleich liegen hier lediglich Studien mit lignanhaltigen Extrakten vor. Weu-Domschke beispielsweise wies *in-vitro* deutliche antiproliferative Effekte verschiedener Leinwurzel-Extrakte auf HMEC in allen getesteten Konzentrationen (50–1000 µg/ml) nach [290]. Der deutliche Unterschied des Ausmaßes der Proliferationshemmung könnte durch die zahlreichen weiteren Substanzen in den Extrakten erklärt werden, die in einer weitaus höheren Konzentration vorkommen als die Lignane selbst.

5.2.3 EINFLUSS DER LIGNANE AUF DEN OXIDATIVEN STRESS UND ZELLSTOFFWECHSEL *IN-VITRO*

5.2.3.1 EINFLUSS DER LIGNANE AUF DEN OXIDATIVEN STRESS DER ZELLEN

Sowohl bei der Initiation als auch bei der Promotion und Progression der Karzinogenese wird oxidativem Stress eine wichtige Rolle zugeschrieben [222]. ROS wie H_2O_2 sind Zwischenprodukte des physiologischen aeroben Zellstoffwechsels. Bei Ungleichgewicht von oxidativer und antioxidativer Kapazität der Zelle können ROS die DNA direkt durch Initiation von Strangbrüchen oder Punktmutationen schädigen sowie Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1 und damit Wachstums-, Zellzyklus-, Apoptose- und Angiogenese-Regulatoren aktivieren [222]. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, eines der vorrangig bei oxidativem Stress entstehenden DNA-Produkte, konnte bei invasiven Brustkrebszellen in einer um ein Vielfaches höheren Konzentration als in normalem Gewebe der gleichen Person gefunden werden [168].

Die H_2O_2 -Konzentration der Negativkontrolle der Zelllinie Hs 578T lag leicht über dem der Zelllinie MCF-12A und deutlich über dem Niveau der Primärkultur der HMEC. Auch in der Literatur wird beschrieben, dass Tumorzellen *in-vitro* deutlich mehr ROS produzieren als unveränderte Zellen [259]. Unter Einfluss der Lignane nahm der oxidative Stress in meinen Versuchsreihen bei der Linie Hs 578T insgesamt leicht um 5–10 % ab, bei Enterodiol und Secoisolariciresinol zum Teil um bis zu 14 %. Die Wasserstoffperoxid-Konzentration schien bei hohen Lignan-Konzentrationen passend zur starken Hemmung der Zellproliferation tendenziell abzunehmen, der Verlauf war aber größtenteils undulierend. Jedoch beeinträchtigen die große Spannweite der beiden Werte der Negativkontrolle sowie die einmalige Messung der Konzentration unter den Lignan-Substanzen die finale Aussagekraft der Ergebnisse.

Der Einfluss der vier Lignane auf die Wasserstoffperoxid-Konzentration der Zelllinie MCF-12A war insgesamt nur sehr gering (± 5 %) und nicht signifikant ausgeprägt. Unter Enterolacton nahm sie mit steigenden Substanzkonzentrationen leicht ab, unter 50 μ g/ml Enterolacton zeigte sich der stärkste Effekt (-5 %). Auch bei Enterodiol und Matairesinol zeigten sich größtenteils leicht erniedrigte H_2O_2 -Mengen, aber eher undulierende Verläufe.

Das Niveau des oxidativen Stresses der Primärkultur der HMEC lag insgesamt deutlich unterhalb der beiden anderen Zelllinien (bei $<1/5$). Als Ursache hierfür kommen einerseits die aufgrund der begrenzten Kultivierbarkeit und Kostenintensivität um 1/3 geringere Zellzahl und damit weniger stoffwechselaktive Zellen, andererseits die weitestgehend erhaltene Stoffwechselaktivität der Zellen dieser Primärkultur sowie das in der Literatur beschriebene

niedrigere Niveau von oxidativem Stress in unveränderten Zellen [168, 259] in Betracht. Die Lignane hatten auf die Primärkultur zudem einen deutlich stärkeren Einfluss als auf die anderen beiden Zelllinien. Ähnlich wie bei der Zelllinie MCF-12A zeigte sich bei der Primärkultur der HMEC passend zur antiproliferativen Wirkung von Enterolacton eine leichte konzentrationsabhängige Reduktion der Wasserstoffperoxid-Konzentration, jedoch nicht unterhalb der Negativkontrolle. Unter Einfluss der anderen drei Lignane zeigten sich undulierende Verläufe mit einer zum Teil 2- bis 6-fachen Reduktion des oxidativen Stresses im Vergleich zur Negativkontrolle, insbesondere bei Secoisolaricireinsol und Matairesinol. Eine mögliche karzinoprotektive Wirkung der Lignane auf unveränderte Zellen wird hier besonders deutlich, die Aussagekraft dieser Werte ist jedoch bei einer nur einmaligen Messung eingeschränkt.

Niemeyer *et al.* untersuchten in ihrer Studie das antioxidative Potenzial der vier auch in dieser Arbeit getesteten Lignane. Mittels sog. *Ferric Reducing / Antioxidant Power Assay* (FRAP Assay) kamen sie zu dem Ergebnis, dass Secoisolariciresinol und Matairesinol in den Konzentrationen 50–400 µmol/l eine deutlich größere antioxidative Kapazität als die Säuger-Lignane Enterodiol und Enterolacton in den Konzentrationen 1000–2000 µmol/l aufweisen. Dies wurde auf die zusätzliche Methylgruppe der pflanzlichen Vertreter zurückgeführt [197] und korreliert mit den Ergebnissen der Primärkultur der HMEC in dieser Arbeit. Eine weitere Untersuchung, die diese Fragestellung an den Substanzen SDG, Enterolacton und Enterodiol untersuchte, stellte mittels verschiedener anderer *in-vitro*-Methoden (z. B. *ammonium thiocyanate assay* und *deoxyribose assay*) fest, dass ENL und END in den Konzentrationen 10 µmol/l und v. A. 100 µmol/l ein höheres antioxidatives und damit antikarzinogenes Potenzial als SDG besitzen [135]. Dies könnte unter anderem mit der Glykosylierung und fehlenden phenolischen Hydroxylgruppen des SDG zusammenhängen, die als Radikalfänger fungieren [135]. Prasad kam mit einer anderen Methode (*chemiluminescence of zymosan-activated polymorphonuclear leukocytes* PMNL-CL) zu ähnlichen Ergebnissen: In einer Konzentration von 2500 µg/ml führten END > SECO > ENL > SDG zu einer Reduktion von ROS [214].

5.2.3.2 EINFLUSS DER LIGNANE AUF DEN GLUKOSEVERBRAUCH DER ZELLEN

Der Glukose-Verbrauch der Zellen liefert einen Hinweis auf die metabolische Aktivität und damit Vitalität der unterschiedlichen Zelllinien unter dem Einfluss der Lignane. Die Glykolyse findet in allen Zellen des menschlichen Organismus statt und ist für den Abbau von Glukose zu Pyruvat und Energie zuständig. Bei Anwesenheit von Sauerstoff wird Pyruvat in der Regel im Rahmen der aeroben Glykolyse über den Zitrat-Zyklus und die oxidative Phosphorylierung zu Energie in Form von ATP umgewandelt. In den 1920er Jahren fanden Warburg *et al.*

heraus, dass Tumor-Zellen neben einer vermehrten Glukose-Aufnahme die besondere Eigenschaft besitzen das Pyruvat auch trotz eines hohen Sauerstoffangebotes mittels anaerober Glykolyse zu Lactat zu verstoffwechseln („Warburg-Effekt“). Dieser energetisch weniger effektive Abbaumechanismus führt unter anderem zu einer Veränderung der Mikroumgebung des Tumors sowie zu Zwischenmetaboliten für andere anabole Stoffwechsel-Reaktionen der Tumoren, welche z. B. die Zellproliferation fördern und die Tumordinvasion erleichtern können [140].

Die Glukosekonzentration in den jeweiligen Nährmedien nahm bei den Negativkontrollen durch den Zellstoffwechsel erwartungsgemäß bei allen Zelllinien ab. Im Zuge der starken Proliferationshemmung wurde daher bei den Zellen der Linie MCF-12A und Hs 578T bei steigender Konzentration der Lignane eine deutliche Verringerung des Glukoseverbrauchs im Vergleich zur Kontrolle erwartet. In Studien konnte zudem festgestellt werden, dass andere sekundäre Pflanzenstoffe wie beispielsweise Quercetin (10–100 μM), ein Polyphenol aus der Gruppe der Flavonoide, *in-vitro* ER-unabhängig die Glukose-Aufnahme in ER-positiven und -negativen Mammakarzinomzellen (MCF-7 und MDA-MB-231) hemmen können. Kompensatorisch kam es zu einer Hochregulation der Expression des Glukose-Transporters GLUT1 [186]. Eine weitere Studie zeigte dass das Flavonoid Silybin bzw. dessen Derivat Dehydrosilybin (0–60 μM) *in-vitro* bei Adipozyten (3T3-L1) und Ovarialzellen Chinesischer Hamster (CHO) die Aufnahme von Glukose über den GLUT-4 kompetitiv hemmen konnten [306]. Diese Zusammenhänge ließen sich aus den gemessenen Glukose-Konzentrationen der Zelllinien jedoch nicht ableiten, da die Unterschiede zur Negativkontrolle minimal und die Streuweite der Ergebnisse groß waren. Auch bei der Primärkultur der HMEC ließen sich keine eindeutigen Abweichungen von der Glukosekonzentration der Negativkontrolle oder konzentrationsabhängige Verläufe der einzelnen Lignane feststellen. Die isolierten Lignane scheinen sich in den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen nicht signifikant auf den Zellmetabolismus auszuwirken.

5.2.3.3 EINFLUSS DER LIGNANE AUF DEN PH-WERT DER ZELLEN

Der pH-Wert dient ebenfalls als Marker für die metabolische Aktivität der Zellen. Bei der zur Proliferation der Tumorzellen notwendigen Energiegewinnung fällt durch die anaerobe Glykolyse Laktat an (siehe Kapitel 5.2.3.2) und führt zu einer Absenkung des pH-Wertes im extrazellulären Milieu. Neben Vorteilen für das Tumorwachstum [140] kann die veränderte Mikroumgebung der Zellen den Zugang und die Sensitivität für Pharmaka in Abhängigkeit von deren jeweiligen chemischen Eigenschaften positiv oder negativ beeinflussen. Schwach basische Substanzen wie Doxorubicin aus der Gruppe der Anthracycline werden bei dieser

Umgebung beispielsweise protoniert und deren Aufnahme in die Tumorzellen infolge der abnehmenden Membranpermeabilität verringert [274].

Infolge der starken konzentrationsabhängigen Proliferationshemmung der Zelllinien MCF-12A und Hs 578T durch die Lignane müsste es mit steigender Konzentration zu einer Abnahme der Glukoseverwertung und damit Annäherung des pH an die Negativkontrolle kommen.

Bei Betrachtung des pH-Wertes zeigte sich bei Zugabe der Lignane jedoch bei keiner der Zelllinien ein deutlicher Einfluss. Der pH-Wert bei der malignen Zelllinie Hs 578T lag durch den hohen pH des Mediums generell über demjenigen der anderen beiden Zelllinien und die Veränderungen lagen stets nahe der Negativkontrolle. Ein Vergleich der Ergebnisse der isolierten Lignane ist aufgrund der mangelnden Datenlage in der Literatur nicht möglich.

5.3 EINFLUSS VON 17B-ESTRADIOL

17 β -Estradiol stellt die biologisch aktivste Form der Estrogene im menschlichen Organismus dar [8]. Über Estrogenrezeptor-abhängige und -unabhängige Mechanismen vermitteln Estrogene zahlreiche sexualspezifische und -unspezifische Wirkungen und spielen eine zentrale Rolle bei der Initiation, Promotion und Progression von Brustkrebs (siehe Kapitel 1.3.3). Je nach Zyklusphase produzieren nicht-schwangere Frauen vor der Menopause prämenstrual täglich 50 μ g bis 70 μ g Estradiol und präovulatorisch 200 μ g bis 400 μ g Estradiol. In der Postmenopause dagegen sinkt die Produktion auf 5 μ g bis 25 μ g pro Tag ab. Dabei entstehen im Serum Konzentrationen von 40 bis 500 pg/ml bei prämenopausalen und < 20 pg/ml bei postmenopausalen Frauen [98]. Waaseth *et al.* stellten fest, dass die Plasma-Estradiol- und FSH-Konzentration bei Frauen, die eine systemische HET einnahmen, mit dem Level von prämenopausalen Frauen vergleichbar waren [283]. In dieser Arbeit wurde 17 β -Estradiol in einer Konzentration von 1×10^{-7} mol/l zu den Zellen gegeben, was unter Berücksichtigung der Verdünnung von 1:100 (1×10^{-9} mol/l) auf den Platten umgerechnet etwa 272,5 pg/ml entspricht. Es handelt sich dabei also theoretisch um einen Wert, der durchschnittlich im Zyklus von prämenopausalen Frauen erreicht wird.

Im LDH-Test zeigte 17 β -Estradiol in der verwendeten Konzentration auf die Zellen der Linie MCF-12A und die HMEC keine, auf die maligne Zelllinie Hs 578T eine leichte, signifikant zellschädigende Wirkung (Median 7,8 %). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Weu-Domschke, die in der gleichen Konzentration keine bzw. geringe nicht-signifikante zytotoxische Effekte durch Estradiol bei den ER-positiven Zelllinien MCF-7 und -12A sowie bei den Hormonrezeptor-negativen Linien MCF-10A und BT-20 beschrieb [290].

17 β -Estradiol führte zudem in der verwendeten Konzentration bei keiner der drei Zelllinien zu signifikant proliferationsfördernden Effekten im Vergleich zur Negativkontrolle. Vielmehr konnte im BrdU-Test bei Zugabe von 17 β -Estradiol bei der benignen Zelllinie MCF-12A eine leichte nicht-signifikante und bei der malignen Zelllinie Hs 578T eine etwas stärkere, signifikante Reduktion der Zellproliferation nachgewiesen werden (Median 94 % bzw. 80 %). Dies bestätigt frühere Ergebnisse, die eine antiproliferative Wirkung von Estradiol in hohen Konzentrationen (1×10^{-7} M bzw. $\geq 1 \times 10^{-6}$ M) auf MCF-7-Zellen beschrieben [239, 287]. Neben einer Hemmung der ER α -vermittelten Proliferation durch den von allen Zelllinien exprimierten ER β kommt auch das Vorhandensein von ER-unabhängigen Mechanismen in Betracht. Passend zu Letzterem konnte bei der vorangegangenen Untersuchung von Weu-Domschke sowohl bei benignen (MCF-10A und MCF-12A) als auch malignen Mammazellen (MCF-7 und BT-20), unabhängig von Rezeptorstatus und Dignität, ein ähnlicher Einfluss mit mäßigen aber signifikant-antiproliferativen Effekten von 17 β -Estradiol beobachtet und auf eine beginnende antiproliferative und zytotoxische Wirkung des Estradiols bei dieser relativ hohen Konzentration zurückgeführt werden [290].

Bei der ER- und PR-Rezeptor-positiven Primärkultur der HMEC dagegen hatte 17 β -Estradiol nahezu keinen Effekt auf die Zellproliferation (Median 100 %). Bei Weu-Domschke hingegen traten bei den HMEC überwiegen proliferative Effekte auf (Median 136 %) [290]. Eine eindeutige Interpretation ist bei der kleinen Anzahl an Ansätzen der beiden Arbeiten ($n = 8$) nicht möglich. Bei einer *in-vitro*-Studie mit Proben normalen unveränderten Brustgewebes konnte jedoch festgestellt werden, dass die ER-exprimierenden Zellen unter Estradiol-Einfluss nicht generell proliferieren, sondern vielmehr als Sensor für Estrogene dienen und über einen parakrinen Mechanismus proliferationssteigernd auf die umgebenden Zellen wirken [51].

Bei Betrachtung der Stoffwechselfparameter der Zellen führte 17 β -Estradiol insgesamt zu sehr geringen, nicht-signifikanten Veränderungen. Es kam bei allen drei Zelllinien zur leichten Abnahme der Glukosekonzentration im Medium, zum Teil unterhalb der Negativkontrolle, sowie zu einer leichten Abnahme des pH-Wertes. Dies könnte zu einer geringen Proliferationszunahme und infolgedessen einem erhöhten Energieverbrauch der Zellen passen. Rivenzon-Segal *et al.* stellten fest, dass es zudem durch Einfluss von Estrogenen bei MCF-7-Zellen *in-vitro* zu einer verstärkten Expression des Glukosetransporters 1 (GLUT-1) und dadurch zu einer verstärkten Glykolyse mit konsekutiv erhöhtem Glukosebrauch der Zellen kommen kann [226].

Der oxidative Stress hingegen nahm bei den Zelllinien MCF-12A und den HMEC minimal zu, bei der Zelllinie Hs 578T minimal ab. In der Literatur findet sich passend dazu bei der ER-positiven Linie MCF-7 unter Einfluss von Estradiol eine deutlich höhere Sensitivität für indu-

zierten oxidativen Stress, bei der ER-negativen Linie MDA-MB-231 hingegen nicht. Die erhöhte Sensitivität für DNA-Schäden durch oxidativen Stress unter Estradiol-Einfluss wird unter anderem einer ER-vermittelten Modulation von antioxidativen Enzymen, beispielsweise der Katalase oder Glutathion, zugeschrieben [182].

Im Vergleich zu den Lignanzen zeigte sich bei 17 β -Estradiol in Bezug auf die Zytotoxizität überwiegend kein signifikanter Unterschied. Bei der Zelllinie MCF-12A war der hemmende Einfluss auf die Zellproliferation von ENL, END und MATA, bei Hs 578T auch von SECO in hohen Konzentrationen signifikant stärker ausgeprägt als derjenige des Estradiols, was die Idee eines möglichen präventiven bzw. therapeutischen Effekt von Lignanzen stützt.

5.4 EINFLUSS VON TAMOXIFEN

Tamoxifen wird als selektiver Estrogenrezeptor Modulator im Rahmen einer antihormonellen Therapie bei Estrogen- und / oder Progesteronrezeptor-positivem Brustkrebs in allen Stadien der Erkrankung als fester Therapiebestandteil eingesetzt. In der Regel wird Tamoxifen prämenopausal für mindestens fünf Jahre mit einer täglichen Dosis von 20 mg eingenommen [68]. Insbesondere von dem Cytochrom-P450-Enzym CYP 2D6, das einen wichtigen Schritt im Tamoxifen-Stoffwechsel katalysiert, sind zahlreiche genetische Polymorphismen bekannt, die zu stark abweichenden Enzymaktivitäten führen. Aufgrund der interindividuellen genetischen Enzymausstattung unterscheiden sich die Plasmakonzentrationen von Tamoxifen und seinen aktiven Metaboliten von Patientin zu Patientin erheblich [31, 235]. Da die entstehenden Metaboliten des Tamoxifens eine vielfach (> 100-fach) höhere Affinität zum Estrogenrezeptor besitzen als Tamoxifen selbst, wird vor allem durch Endoxifen, das in über sechsfach höheren Plasmakonzentrationen vorkommt als 4-Hydroxy-Tamoxifen, der überwiegende Anteil der Tamoxifen-Wirkung vermittelt [126, 155]. *In-vitro*-Studien mit Tamoxifen sind daher nur bedingt mit dem menschlichen Organismus vergleichbar [8]. Tamoxifen erreicht im Plasma Konzentrationen zwischen 190 und 420 nmol/l [31]. Unter Berücksichtigung der Verdünnung auf der Platte entspricht die in dieser Arbeit hinzugegebene Tamoxifen-Konzentration von 1×10^{-4} mol/l in etwa 10.0000 nmol/l, also ca. das 240- bis 530-fache der durchschnittlichen Plasmakonzentration. Durch die Verwendung einer derart hohen Tamoxifen-Konzentration soll die im Organismus vorwiegend durch die aktiven Metabolite bedingte Wirkung berücksichtigt und imitiert werden.

Tamoxifen wirkte im Vergleich zu den Negativkontrollen auf die Zellen aller drei Zellreihen (MCF-12A, HMEC und Hs 578T) stark und signifikant zytotoxisch (Median 118 %, 113 % und 123 %). Darüber hinaus führte es sowohl bei der benignen ER- und PR-positiven Zelllinie

MCF-12A als auch bei der malignen ER α -negativen Zelllinie Hs 578T zu einer ausgeprägten signifikanten Hemmung der Zellproliferation auf unter 1 % der Negativkontrolle. Passend dazu war auch der Glukoseverbrauch bei diesen beiden Zelllinien im Vergleich zur Negativkontrolle geringer und der pH-Wert im Vergleich zur Kontrolle höher. In der Literatur finden sich auch für ER- und PR-negative Zellen, wie beispielsweise der benignen Mammazelllinie MCF-10A und der malignen Mammakarzinomzelllinie BT-20, zytotoxische und antiproliferative Wirkungen ähnlicher Größenordnung [1, 78, 290]. Dies deutet auf ER-unabhängige Mechanismen von Tamoxifen hin. In der Literatur wurden beispielsweise die Induktion von Apoptose über die Aktivierung des ERK1/2- oder Inhibition des CIP2A/PP2A/p-Akt-Signalwegs und die Reduktion der zellulären Glutamin-Aufnahme über die Hemmung der Expression des Glutamin-Transporters ASCT2 als potenzielle Mechanismen nachgewiesen [158, 271, 307]. Weiterhin könnte bei allen Zelllinien in dieser Arbeit der ER β eine Rolle spielen (siehe Kapitel 5.5).

Bei der ER- und PR-Rezeptor-positiven Primärkultur der HMEC dagegen hatte Tamoxifen in dieser Arbeit, genauso wie 17 β -Estradiol, bei einer kleinen Zahl an Ansätzen ($n = 8$) und einer großen Spannweite der Ergebnisse, keinen signifikanten Effekt auf die Zellproliferation. In der Studie von Weu-Domschke hingegen wurden durch Tamoxifen in der gleichen Konzentration auch bei diesen primären Zellen deutliche antiproliferative Effekte festgestellt, jedoch ebenfalls mit einer großen Spannweite der Ergebnisse [290]. Letzteres würde zu dem verringerten Glukoseverbrauch der HMEC unter Tamoxifen-Einfluss und dem erhöhten pH-Wert im Vergleich zur Negativkontrolle in dieser Arbeit passen. Rivenzon-Segal *et al.* zeigten zudem, dass es bei der Zelllinie MCF-7, entgegengesetzt zur Wirkung von 17 β -Estradiol, *in-vitro* zu einer verminderten Expression des GLUT-1 und damit der Energiegewinnung mittels Glykolyse kommen kann [226].

Bei Betrachtung des oxidativen Stresses zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse. Bei der Zelllinie MCF-12A und den HMEC war die H₂O₂-Konzentration zwar im Vergleich zur Negativkontrolle auch unter Tamoxifen erhöht, lag jedoch niedriger als unter dem Einfluss von 17 β -Estradiol. Dies passt zur Abschwächung der Estrogen-vermittelten Hemmung von antioxidativen Enzymen durch Tamoxifen [182]. Zudem konnte in einer Studie von Montano *et al.* bei der ER-positiven Zelllinie MCF-7 durch Interaktion von Tamoxifen mit dem *antioxidative response element* des Chinon-Reduktase-Gens eine Hochregulation der Chinon-Reduktase und damit ein möglicher Mechanismus für die Verringerung von oxidativem Stress gezeigt werden [184]. Bei der Linie Hs 578T dagegen übte Tamoxifen in dieser Arbeit, genauso wie Estradiol, eine Reduktion des oxidativen Stresses aus, was mit dem ER β in Verbindung ge-

bracht werden könnte und gleichzeitig bei großer Streuweite der Werte nur unter Vorbehalt zu interpretieren ist.

Der zytotoxische und proliferationshemmende Einfluss von Tamoxifen auf die Zelllinien MCF-12A und Hs 578T war signifikant stärker ausgeprägt als derjenige der Lignane in allen Konzentrationen. Bei der Primärkultur der HMEC war zwar die zytotoxische Wirkung signifikant stärker als die der Lignane, beim Einfluss auf die Zellproliferation hingegen zeigte sich unter Tamoxifen zu den Lignanen kein signifikanter Unterschied.

5.5 DIE ROLLE DES ESTROGENREZEPTORS BETA

Dem Estrogenrezeptor β bzw. dem Verhältnis von ER α und ER β im Gewebe, wird zunehmend eine protektive Rolle gegenüber der Entstehung und Progression von Brustkrebs zugeschrieben und der ER β als unabhängiger prädiktiver Parameter einer antihormonellen Therapie sowie als prognostischer Marker diskutiert [84, 102, 147, 157, 231, 242, 261, 275].

Der ER β wird sowohl in normalem Brustdrüsengewebe als auch von Mammakarzinomzellen exprimiert [205]. Bei Vorhandensein beider Rezeptoren wird in Brustkrebszellen über den ER β die Expression zahlreicher ER α -regulierter Gene gehemmt, die unter anderem wichtige Regulatoren der Zellproliferation und des Zellzyklus darstellen. *In-vitro* konnte in Proliferations-Assays bei Expression des ER β der Zellen die Estrogen-induzierte Zellproliferation über den ER α komplett unterbunden werden [292]. Passend dazu kam es in einer *in-vitro* Studie von Treeck *et al.* bei *knockdown*, also Deaktivierung, des ER β bei der ER α - und ER β -positiven Zelllinie MCF-7 und der ER α -negativen Zelllinie MCF-10A Liganden- bzw. ER α -unabhängig zu einer deutlichen Wachstumszunahme [275]. Auch von Schüler-Tropjak *et al.* konnte eine Zunahme der Zellproliferation sowie eine dreifach höhere Invasivität der ER α -negativen Zelllinie MDA-MB-231 bei ER β -*knockdown* festgestellt werden [238].

Passend dazu wird die Karzinogenese von Mammakarzinomen mit einem Verlust bzw. einer Verringerung der ER β -Expression in Verbindung gebracht [147, 231, 242]. Beispielsweise konnten Shaaban *et al.* in ihrer immunhistochemischen Analyse von 283 Mammakarzinom-Präparaten eine Abnahme der ER β -Expression von im Mittel 94,3 % der Zellen in normalem Brustgewebe über 76,7 % bei duktaler Hyperplasie, 70,0 % beim DCIS und 60,0 % bei invasiven Karzinomen nachweisen [242]. In einer weiteren Studie von Huang *et al.* wurde durch genauere Differenzierung bei invasiv-duktalem Karzinomen eine ER β -Expression von nur 10 % festgestellt. Huang *et al.* konnten zudem zeigen, dass dabei deutliche Unterschiede zwischen duktalem und lobulärem Karzinomen sowie eine negative Korrelation mit dem histo-

logischen Grading existieren. Während in duktaalen Karzinomen im Gegensatz zu deren Vorstufen vor allem der ER α nachgewiesen werden konnte und es bei *high-grade* Tumoren zu einem kompletten Verlust von ER α und - β kommen kann, zeigte sich in lobulären Karzinomen in frühen Stadien eine Expression beider Estrogenrezeptoren mit einem Verlust des ER β und einer Proliferationszunahme bei fortgeschrittener Erkrankung [116].

Bisher wird in der Klinik der ER α standardmäßig für die Indikation einer antihormonellen Therapie bestimmt. Fakt ist aber, dass einerseits nicht alle ER α -positiven Mammakarzinome auf Tamoxifen ansprechen und andererseits auch einige ER α -negative Tumore auf den Estrogenentzug reagieren [170]. Reese *et al.* gehen davon aus, dass etwa 30 % der triple-negativen Mammakarzinome den ER β exprimieren [220]. Die Bedeutung des ER β sowie mögliche Mechanismen werden aktuell in zahlreichen Studien untersucht.

In einer Studie von Hartman *et al.* aus dem Jahr 2006 führte ein modifiziertes ER β -positives Xenograft der ER α -positiven Mammakarzinomzelllinie T47D in immunodefizienten Mäusen neben der Reduktion des Tumolvolumens zu einer Abnahme von Ki67, der Anzahl von Blutgefäßen der Tumore sowie von proangiogenetischen Faktoren wie dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und dem *platelet-derived growth factor β* (PDGF β) *in-vivo*. *In-vitro* zeigte sich bei der ER β -positiven Variante ebenfalls eine reduzierte Expression von VEGF- und PDGF β -mRNA [106]. Weitere Studien bestätigen die proliferations-, invasions- und wachstumshemmende Wirkung des ER β [39, 147, 206, 256, 275] auch in ER α -negativen Zellen [147, 221] und *in-vivo* [220], beispielsweise durch Regulation des Zellzyklus über die Beeinflussung von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (z. B. Cyclin D1 oder CDK1) [206, 220, 256]. Auch oxidativer Stress als möglicher Initiator von DNA-Schäden wird über den ER β beeinflusst. Die Chinon-Reduktase, ein Enzym des Vitamin E-Stoffwechsels, hat Anteil an der antioxidativen Kapazität des Organismus. In einer *in-vitro*-Studie stellten Montano *et al.* fest, dass bei der ER α - und ER β -positiven Brustkrebszelllinie MCF-7 der ER β einen potenteren Aktivator der *electrophile response elements* des Chinon-Reduktase-Gens darstellt als der ER α [183].

Über den Zusammenhang des ER β und dem prädiktiven Wert einer antihormonellen Therapie wurde in der Literatur in den ER α -positiven Zelllinien T47-D und MCF-7 bei ER β -Expression eine Herabregulation des Protoonkogen-Dimers *c-ErbB-2/receptor tyrosine kinase erbB-3* (HER2/HER3) aus der EGFR-Familie und gleichzeitig eine Verstärkung des Akt-Inhibitors und Tumorsuppressors *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10* (PTEN) beschrieben. Das Dimer HER2/HER3 ist mit einem schlechten Ansprechen auf endokrine und HER2-Inhibitor-Therapie assoziiert, die Expression von PTEN ist in malignen Brusttumoren oft verloren gegangen und mit einem schlechten Outcome vergesellschaft-

tet. Die über den ER β vermittelten Veränderungen führen zur Hemmung des Akt-Signalwegs, der eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Zellproliferation, Wachstum und Apoptose spielt und bei Aktivierung mit einer Tamoxifen-Resistenz und einem verringerten Gesamtüberleben assoziiert ist. Dies trägt womöglich einen Anteil an der erhöhten Tamoxifen-Sensitivität der beiden Zelllinien bei ER β -Expression bei [157]. Treeck *et al.* konnten feststellen, dass ein *knockdown* des ER β bei der ER-positiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7 zu einer verringerten Tamoxifen-Sensitivität führt, bei der benignen ER α -negativen Zelllinie MCF-10A jedoch nicht [275].

Epidemiologische Studien zeigten bisher, bei starker Heterogenität der Methoden, ebenfalls keine eindeutigen Ergebnisse. In einem Review aus dem Jahr 2014 beschrieben Haldosen *et al.* bei der Mehrzahl der analysierten Studien einen positiven Zusammenhang von ER β -Expression und günstigen prognostischen Markern des Mammakarzinoms wie ER α -Expression, geringer Tumorgöße und negativem Lymphknotenstatus sowie einem verlängerten krankheitsfreien Überleben. Eine negative Assoziation fand sich zur HER2-Expression. Andere Studien stellten jedoch auch gegenteilige Effekte fest. Diese *bi-faced role* des ER β ist möglicherweise abhängig von dem Vorhandensein bzw. der Abwesenheit des ER α sowie zusätzlich von der jeweiligen Isoform des ER β [102]. Die Mehrzahl an Studien aus dem Review von Fox *et al.* beschreibt ein günstigeres Ansprechen von ER α -positiven Tumoren auf eine adjuvante Tamoxifen-Therapie bei Expression des ER β . Wird nur der ER β exprimiert wurde allerdings eine Assoziation zu einem verringerten Ansprechen auf die endokrine Therapie und einem schlechteren Outcome beschrieben. Ob dieses Ergebnis mit dem ER β oder anderen Faktoren, wie der HER2-Expression in *high-grade* Tumoren oder unterschiedlichen Tumortypen zusammenhängt, ist unklar [84]. Eine neuere Metaanalyse von Tan *et al.* beschreibt den ER β als günstigen prognostischen Parameter für das krankheitsfreie- und das Gesamtüberleben, insbesondere bei ER α -negativen Tumoren. Die Rolle des ER β als prädiktiver Faktor bei der endokrinen Therapie blieb jedoch auch hier aufgrund der abweichenden Studienergebnisse offen [261]. Die biologischen Hintergründe sind nach wie vor weitestgehend unklar und bedürfen bei der vorliegenden Inhomogenität der Ergebnisse weiterer Aufklärung.

Auf die Zellen der Linie Hs 578T dieser Arbeit, als Vertreter eines triple-negativen Karzinoms mit Expression des ER β , zeigte sich unter dem Einfluss der Lignane einerseits eine höhere Zytotoxizität als bei den ER α - und ER β -positiven MCF-12A-Zellen, andererseits eine ebenso bzw. teilweise stärkere Proliferationshemmung. Zudem sprachen die Hs 578T-Zellen in den hier verwendeten Konzentrationen ebenso gut bzw. teilweise stärker auf Tamoxifen an als die ER α - und ER β -positive Zelllinie MCF-12A, was die Ergebnisse der Metaanalyse von Tan *et al.* [261] stützt.

Die potenziellen antitumorigenen Eigenschaften des ER β bieten im Sinne einer zielgerichteten Therapie einen Ansatzpunkt für selektive pharmakologische Interventionen [112, 116, 238]. Nach Huang *et al.* könnten ER β -Agonisten demnach vor allem bei Prävention von invasiven duktalem Karzinomen und Tamoxifen als ER α -Antagonist insbesondere bei fortgeschrittenen lobulären Karzinomen eingesetzt werden [116]. Schüler-Topjak *et al.* untersuchten 2016 in einer *in-vitro* Studie den Einfluss selektiver Pharmaka auf triple-negative Tumorzellen. Die spezifischen ER β -Agonisten ERB-041 und WAY200070 führten bei den Zelllinien MDA-MB-231 (starke ER β -Expression) und Hs 578T (schwache ER β -Expression), die Agonisten Liquiritigenin und 3 β -Adiol zusätzlich bei der Linie MDA-MB-231, zu einer verminderten Zellinvasion [238]. Hinsche *et al.* wiesen zudem bei Behandlung der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin und ERB-041 zwar keine Veränderung der Zellproliferation, jedoch eine Invasionshemmung und bei Liquiritigenin eine signifikante Reduktion der Expression des Proteins CXCR4 nach, das eine wichtige Rolle bei der Metastasierung spielt [112]. Auch Phytoestrogene, beispielsweise Genistein und Coumestrol, kommen aufgrund ihrer um ein Vielfaches höheren Affinität zum ER β als zum ER α [191] unter diesem Gesichtspunkt in Frage. Bei Zellen, die nur den ER β exprimieren stellen Lignane scheinbar eine ebenbürtige Alternative dar. Bei fehlenden klinischen Studien werden bisher noch keine ER β -Agonisten zur Mammakarzinom-Therapie eingesetzt.

Bei der Vielseitigkeit des Mammakarzinoms besteht der Bedarf, die Rolle des ER β durch molekulare Charakterisierung vieler verschiedener Mammakarzinom-Zellproben, genauerer Untersuchung der ER β -Isoformen sowie der Evaluation ihres prädiktiven und prognostischen Potenzials in epidemiologischen Studien weiter aufzuschlüsseln. Gleichzeitig muss der Einfluss von ER-selektiven therapeutischen Substanzen *in-vivo* und klinisch weiter untersucht werden, um das Mammakarzinom jedes Patienten individuell optimal therapieren zu können [102].

5.6 METHODIK

Bei der benignen Epithelzelllinie MCF-12A sowie der maligne Karzinomzelllinie Hs 578T handelt es sich um immortalisierte Zellen, die aufgrund ihres unbegrenzten Teilungspotenzials, relativ homogener Eigenschaften und guter Verfüg- und Kultivierbarkeit Grundlage vieler *in-vitro*-Zellversuche darstellen [36]. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass es im Laufe des langen Kultivierungsprozesses zwischen den Passagen zu einer Veränderung der genetischen Ausstattung und der biologischen Eigenschaften kommen kann [202]. Bei der Untersuchung der Zelllinie MCF-7 aus verschiedenen Laboren konnten trotz identischer Morphologie der Zellen beispielsweise unterschiedliche Karyotypen, Wachstumsraten und Hormon-

rezeptorexpressionen nachgewiesen werden [202], was möglicherweise die zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse verschiedener Studien erklären könnte.

Im Gegensatz zu den permanenten Zelllinien MCF-12A und Hs 578T handelt sich bei Primärkulturen um Zellen mit langsamer Populationsverdopplung sowie begrenzter Teilungskapazität und Lebensdauer. Da diese Zellen direkt bzw. nach wenigen Subkultivierungen verwendet werden sind ihre molekularen Charakteristika und die metabolische Kapazität weitestgehend erhalten. Primärkulturen stellen damit ein repräsentativeres Model für das Ursprungsgewebe als permanente Zelllinien dar. Die Informationen von Primärkulturen können als eine Art Verbindungselement zwischen den Zellversuchen mit immortalisierten Linien und *in-vivo*-Versuchen verstanden werden [236]. Gleichzeitig ist ihre Kultivierbarkeit aufgrund der physiologischen Seneszenz auf oft nur zwei bis drei Passagierungen begrenzt [36]. Da die Versuche mit den HMEC aufgrund der oben genannten Eigenschaften nur einmalig mit je vier Ansätzen und reduzierter Zellzahl durchgeführt werden konnten ist die Aussagekraft dieser Ergebnisse begrenzt und die Vergleichbarkeit mit der benignen Zelllinie MCF-12A erschwert. Für eine allgemeine Aussage müsste sie durch größere Versuchsreihen validiert werden.

Die verwendete Zellzahl selbst stellt eine weitere Fehlerquelle dar. Abweichungen werden meist durch nicht ausreichende Durchmischung der Zellsuspension verursacht [99]. Sie beeinflussen die daraufhin ausgesäte Zellzahl bei jedem Versuchsansatz der kolorimetrischen Assays und der Stoffwechseluntersuchungen. Möglicherweise weisen auch die Extrakte und Kontrollsubstanzen je nach Durchmischung und Homogenität unterschiedliche Konzentrationen auf. Auf der Mikrotiterplatte kann es zusätzlich zu unterschiedlich guter Adhärenz und Verteilung der Zellen kommen [163], was sich wiederum auf deren physiologische Eigenschaften und letztlich auf die Beeinflussbarkeit durch die Testsubstanzen auswirken kann.

Alle aufgeführten Fehlerquellen können die teilweise großen Spannweiten der Ergebnisse mit bedingen und müssen stets bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden.

5.7 LIGNANE ALS PRÄVENTIVE ODER THERAPEUTISCHE OPTION BEIM MAMMAKARZINOM?

Insbesondere auf die Zellen eines Vertreters der triple-negativen aber ER β -positiven Mammakarzinome (Hs 578T) übten die Lignane starke antiproliferative und teilweise zytotoxische Effekte aus, ohne dabei auf gesunde oder benigne veränderte Zellen (HMEC und MCF-12A) signifikant zytotoxisch oder proliferationsfördernd zu wirken. Stattdessen vermittelten die Lignane auch auf die benigne veränderten Zellen MCF-12A eine starke, auf die normalen Mammazellen HMEC eine leichte, nicht-signifikante Proliferationshemmung.

Gleichzeitig kam es unter dem Lignan-Einfluss teilweise zu einer Reduktion des oxidativen Stresses, insbesondere bei der Primärkultur der HMEC, was zusätzlich ROS-vermittelten karzinogenen Effekten vorbeugen könnte. Der Zellmetabolismus wurde dabei bei keiner der drei Zelllinien signifikant beeinflusst. Lignane stellen mit ihren Eigenschaften also theoretisch Substanzen dar, die das Potenzial besitzen sowohl präventiv als auch therapeutisch bei benignen Veränderungen der Mamma oder einer Brustkrebserkrankung eingesetzt zu werden.

In-vitro-Versuche mit Zellkulturen stellen die Grundlage für die Erforschung des Einflusses neuer pflanzlicher Substanzen, wie beispielsweise der Lignane, auf gut- und bösartig veränderte Zellen dar. Unter standardisierten äußeren Bedingungen können Wirkung und Wirkungsmechanismus sowie Dosis-Wirkungsbeziehungen untersucht werden.

Studien an Zelllinien, wie in dieser Arbeit, besitzen jedoch in ihrer Aussagekraft einige limitierende Faktoren. Als erstes wird nur ein sehr begrenzter Anteil der Vielfalt an verschiedenen Zellen der Mamma und des Mammakarzinoms untersucht, die nur einen kleinen Ausschnitt der komplexen Erkrankung darstellen. Vernachlässigt wird dabei zudem das Verhalten der Zelle im Gesamtorganismus bei einem physiologischen Gewebeaufbau, wie Zell-Zell-Interaktionen. In der weiblichen Brust spielt die Interaktion mit dem umgebenden Stroma, einem Netzwerk aus verschiedenen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM), eine entscheidende Rolle. Stromazellen, beispielsweise Fibroblasten, beeinflussen über direkten Zellkontakt, parakrine Sekretion von verschiedensten regulatorischen Faktoren und Remodellierung der ECM die Entwicklung und Differenzierung der Mamma sowie die Entstehung und Metastasierung von Mammakarzinomen [45, 50, 114].

Weiterhin bleibt in dieser Arbeit die Bioverfügbarkeit der Lignane außen vor. Bei Lignanenen sind vor allem die von Mensch zu Mensch abweichende bakterielle Mikroflora des Darmes und damit die große Differenz im Lignanmetabolismus zu bedenken. Da die Mikroflora von zahlreichen externen Einflussfaktoren, wie der Ernährungsweise oder Medikamenteneinnahme, abhängig ist, können auch intraindividuelle Schwankungen der Lignan-Konzentration im Organismus nicht exakt vorausgesagt werden [4]. Insbesondere durch das Fehlen der Leber- und Darmfunktion *in-vitro* kann auch die Wirkung wichtiger Stoffwechselmetaboliten, die zum Teil eine andere biologische Aktivität besitzen als die Ursprungssubstanzen (z. B. Tamoxifen-Metaboliten), in Zellversuchsreihen nur ungenügend dargestellt werden. Hinzu kommt, dass *in-vivo* neben der Aufnahme und dem Stoffwechsel auch die Ausscheidung und der enterohepatische Kreislauf einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der Lignane nehmen. Zusätzlich ist das Verteilungsmuster der einzelnen Substanzen gewebeabhängig und inhomogen. Beispielsweise weicht die Konzentration von verschiedenen Polyphenolen in Plasma

und Zielgewebe wie Brust oder Prostata je nach Substanz deutlich ab [169]. Eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehungen von Lignanenen konnten so bisher nicht ermittelt werden.

Beim präventiven Aspekt steht neben der Menge auch der Zeitpunkt der Aufnahme zur Diskussion. *In-vivo*-Versuche zeigten, dass es bei Ratten unter einer Diät mit 5 % bzw. 10 % Leinsamen während der gesamten Lebensdauer, Schwangerschaft oder Laktationsperiode jeweils zu verstärkten strukturellen Differenzierungsprozessen der Brustdrüse bei den Nachkommen kommt [260, 273, 286]. Bei einer Diät mit einer äquivalenten Menge SDG während des Säugens zeigte sich der gleiche Effekt [260]. Da sich bei einer Substitution nach dem Abstillen kein Zusammenhang mit dem Brustkrebsrisiko zeigte [273] spricht dies vor allem für eine Risikoreduktion durch Lignane bei Exposition schon in frühen Lebensphasen. Ähnliche Versuche mit Ratten zeigten zudem eine Reduktion von Tumorinzidenz, -größe und -anzahl von chemisch induzierten Mammatumoren, wenn die Mütter während des Säugens eine Diät mit 10 % Leinsamen oder eine äquivalente Menge SDG erhalten hatten [42]. Passend zu den Erkenntnissen aus Tierversuchen zeigte eine Fall-Kontroll-Studie anhand von Lebensmittel-Fragebögen von mehr als 6.000 heranwachsenden kanadischen Mädchen, dass sowohl eine hohe Isoflavon- als auch Lignanaufnahme im Jugendalter mit einem erniedrigten Brustkrebsrisiko einhergeht [264]. Auch weitere Studien mit amerikanischen Frauen asiatischer Herkunft stellten bei Beginn eines hohen Soja-Konsums bereits in der Jugend und insbesondere der Kindheit eine Reduktion des Brustkrebsrisikos fest [139, 296]. Im Rahmen der Shanghai Women's Health Study – eine Studie die die Ernährung im Jugend- und Erwachsenenalter von mehr als 73.000 chinesischen Frauen untersuchte – wurde ein protektiver Effekt von soja- bzw. isoflavonreicher Ernährung im Jugend- und Erwachsenenalter für prämenopausalen Brustkrebs festgestellt [149]. Bei Anderson *et al.* hingegen zeigte sich in einer Fall-Kontroll-Studie mit etwa 5.800 Teilnehmerinnen, dass ein hoher Isoflavon- und Lignankonsum in der Jugend vor allem postmenopausal mit einem erniedrigten Brustkrebsrisiko assoziiert ist. Ein signifikanter Zusammenhang fand sich insbesondere für Estrogen- und Progesteronrezeptor-positive Karzinome [10].

Da das Brustdrüsengewebe bis ins frühe Erwachsenenalter Ausreifungsprozessen unterliegt wird vermutet, dass der Phytoestrogenkonsum und damit der estrogene Einfluss in der Kindheit bzw. Jugend mit einer vorgezogenen Ausdifferenzierung des Drüsengewebes zusammenhängt, wodurch die Sensitivität für Karzinogene sinkt. Ein möglicher Mechanismus stellt die Beeinflussung der Expression des EGF-Rezeptors dar. Die frühere Differenzierung der Drüsenzellen führt im Erwachsenenalter zu einer geringeren Aktivität dieses Signalwegs und reduziert damit das Risiko für Brustkrebs [144, 260]. Die Ausdifferenzierung von Brustdrüsenzellen könnte auch für die Risikoreduktion für Brustkrebs bei einer frühen ersten Schwangerschaft eine Rolle spielen [144].

Ein entscheidender weiterer Punkt, der bei einem pharmakologischen Einsatz von Lignanen beachtet werden müsste, sind mögliche Nebenwirkungen. Nach einer Metaanalyse von 92 Studien mit insgesamt rund 9.630 Teilnehmern, welche die Inzidenz von Nebenwirkungen unter der Einnahme von Phytoestrogenen mit einer Placebo-Therapie oder keiner Therapie verglich, zeigten sich zusammenfassend keine signifikanten Unterschiede. Einzeln betrachtet kam es jedoch signifikant häufiger zu gastrointestinalen Beschwerden, muskuloskelettale oder neurologische Effekte traten in beiden Gruppen gleich oft auf. Hormonell bedingte gynäkologische Nebenwirkungen wie vaginale Blutungen, Endometriumhyperplasie, Endometriumkarzinome oder Mammakarzinome zeigten ebenfalls keine signifikante Häufung unter Phytoestrogen-Substitution. Obwohl sich die Studien in Menge und Zusammensetzung der Supplemente unterschieden und Langzeiteffekte bei zum Teil geringen Beobachtungszeiträumen nicht erfasst werden konnten, ist eine Supplementierung mit Phytoestrogenen über zwei Jahre laut Tempfer *et al.* als unbedenklich einzuschätzen [262].

Bei einer kleinen Studie (n = 32) von Thompson *et al.* konnte bei dem Verzehr eines Muffins mit 25 g Leinsamen über 32 Tage bei neu diagnostizierten Brustkrebs-Patientinnen neben einem Rückgang von Zellproliferation, Ki-67 und c-erB2-Expression sowie erhöhter Apoptoserate der Tumoren, eine signifikant erhöhte Lignanausscheidung im Urin und lediglich leichte gastrointestinale Beschwerden wie Völlegefühl oder verstärkte Darmmotilität im Vergleich zu einer Placebo-Gruppe festgestellt werden [270]. Eine andere Studie beobachtete 87 postmenopausale Frauen, die über 16 Wochen Muffins mit 25 g Soja, 25 g Leinsamen oder keinem Zusatz zu sich nahmen. Hier konnte zwar keine signifikante Besserung postmenopausaler Beschwerden, jedoch auch keine signifikanten Unterschiede in den Nebenwirkungen beobachtet werden [152]. Auch ein Review von 2010 bewertete die Einnahme von Leinsamen und anderen Inhaltsstoffen wie SDG anhand der Datenlage aus Tier- und epidemiologischen Studien als sicher [7]. Eczko untersuchte 2015 zudem die potenziell zellschädigende Wirkung eines wasserbasierten Leinwurzel-Extraktes auf primäre humane Hepatozyten und stellte zwar eine vorübergehende Syntheseminderung von Harnstoff und Albumin, jedoch keinen zytotoxischen Einfluss fest [78]. Da Leinsamen auch zahlreiche andere Inhaltsstoffe, beispielsweise Balllaststoffe, enthalten, ist der tatsächliche Anteil der Lignane an den Nebenwirkungen nach wie vor nicht geklärt.

Zuletzt wird die Entwicklung eines Mammakarzinoms multifaktoriell von zahlreichen internen und externen Faktoren bestimmt, die sich wechselseitig beeinflussen können und noch nicht vollständig verstanden sind. Allein in der Nahrung finden sich unzählige Stoffe mit bisher unbekanntem Einfluss.

Gegenstand der aktuellen Forschung ist die Weiterentwicklung von *in-vitro* Methoden, wie 3-D-Kulturen oder sog. *organ-on-a-chip-models*, welche die Zellen und deren physiologische

Umgebung bzw. ganze Gewebe oder Organsysteme inklusive Blutkreislauf nachbilden sollen. So könnten in Zukunft komplexe multifaktorielle Zusammenhänge und Mechanismen wie beispielsweise Tumorentstehung und -metastasierung sowie die Wirkung neuer Pharmaka *in-vitro* näher am menschlichen Organismus erforscht und Tierversuche reduziert werden. Choi *et al.* entwickelten beispielsweise ein 3D-Model eines DCIS aus Mammakarzinomzellen, Mammaepithelzellen und -fibroblasten, Bray *et al.* eine biotechnologisch erzeugte 3D-Kultur einer Tumor-Mikroumgebung, welche die Angiogenese von Mamma- und Prostatakarzinomen nachbilden soll. Bersini *et al.* forschten an einem 3D-Model mit einer Matrix aus Knochen- und Endothelzellen, um die Metastasierung von Brustkrebs in Knochen besser zu verstehen. Chipbasierte mikrofluidische Systeme ermöglichen darüber hinaus die Verbindung von mehreren über eine Mikrokrozirkulation verbundenen Organäquivalenten. Xiao *et al.* entwickelten einen Multi-Organ-Chip des weiblichen Genitaltraktes, der Ovarien, Tuben, Uterus und Leber sowie Blutzirkulation nachbildet. Komplexe Stoffwechsel- oder immunologische Reaktionen machen *in-vivo*-Versuche und klinische Studien bisher jedoch unabdingbar.

Das Potenzial der Phytoestrogene, insbesondere der Lignane, zieht immer neue Untersuchungen nach sich. Neben einem präventiven oder therapeutischen Einsatz für beispielsweise Mamma- oder Prostatakarzinome [249] sind Lignane als natürliche SERMs möglicherweise auch für die antihormonelle Therapie oder den Fall einer Tamoxifen-Resistenz denkbar. Zudem wird ihre Verwendung als HET-Ersatz bei klimakterischen Beschwerden diskutiert [44]. Auch bei postmenopausaler Osteoporose oder kardiovaskulärem Risiko könnten Lignane eine Rolle spielen ohne dabei das Risiko für ein Karzinom der Brust und Gebärmutter zu erhöhen oder sich negativ auf das Herz-Kreislauf-System auszuwirken [249]

Bisher kann man wohl darauf schließen, dass eine Lignan-reiche Ernährung einen protektiven Einfluss auf Brustkrebs haben kann. Welche Rolle genau dabei die Lignane oder weitere Nahrungsinhaltstoffe spielen ist aufgrund der inkonsistenten Studienlage weiterhin unklar. Diese und andere Studien mit isolierten Lignanenen deuten jedoch darauf hin, dass sie einen entscheidenden Anteil der Wirkung von Leinsamen oder Leinpflanzen-Extrakten vermitteln [1, 266, 284].

Morton *et al.* untersuchten bei 23 postmenopausalen australischen Frauen die Plasmakonzentrationen von Lignanenen (END, ENL) und anderen Phytoestrogenen nach einer Diät mit Zusatz von Leinsamen, Soja und Klee-Sprossen für jeweils zwei Wochen. Vor der Substitution zeigten sich insgesamt, wie zu erwarten, je nach Ernährungsweise unterschiedliche Basalkonzentrationen von Enterodiol und Enterolacton (meist zwischen 0–5 ng/ml und

0–10 ng/ml), die Konzentration von Enterolacton war in der Regel um ein Vielfaches höher. Zum Teil wurden jedoch auch deutliche höhere Werte bis zu 70 ng/ml gemessen. Bei der Diät mit 25 g Leinsamen täglich zeigten sich Enterolignan-Konzentrationen bis insgesamt 500 ng/ml. Enterolacton konnte mit einem Maximum von 244 ng/ml und Enterodiol von 390 ng/ml gemessen werden. 250 ng/ml Enterodiol entsprechen 0,25 µg/ml, also etwa ein Viertel der geringsten in dieser Arbeit verwendeten Lignankonzentration [188]. Da in Studien vor allem in höheren Konzentrationen die gewünschten antitumorigenen Effekte auftraten, müssten deutlich größere Mengen an Leinsamen aufgenommen werden. Eine Studie, welche die Auswirkungen der Aufnahme entsprechend großer Stoffmengen erforscht existiert noch nicht. Auch eine Extrakterstellung mit einem höher konzentrierten Lignan-Anteil oder die Zufuhr von isolierten Lignan könnte der gewünschten Plasmakonzentration näherkommen. Adlercreutz ging 2007 jedoch davon aus, dass Lignane nur in Zusammenhang mit „fiber“ oder „cereal fiber“, die diese Lignane und andere Inhaltsstoffe wie Ballaststoffe und α -Linolensäure enthalten, Krebs und CVD vorbeugen können. Lignane alleine seien dazu nicht in der Lage und könnten in den erforderlichen Mengen nicht ausreichend über einen längeren Zeitraum aufgenommen werden [4].

Die *Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.* (DGE) spricht aufgrund der gegenwärtig fehlenden Kenntnisse aus Interventionsstudien mit isolierten Substanzen keine Zufuhrempfehlungen für einzelne sekundäre Pflanzenstoffe aus. Auch sie geht davon aus, dass für ihre Wirkung möglicherweise die Aufnahme „im Verbund“ mit anderen Inhaltsstoffen notwendig sei [66]. Von der *Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e. V.* (AGO) wurde 2017 für den Einsatz von Phytoestrogenen / Soja sowohl für die Prävention als auch die Rezidivprophylaxe von Brustkrebs keine generelle Empfehlung ausgesprochen (AGO *Grade of Recommendation* „+/-“). Dies bedeutet, dass sich bei der Einnahme kein Benefit für alle Patienten zeigt und eine Substitution nur ggf. in individuellen Fällen angewendet werden kann. Als komplementärer Ansatz hingegen wird zur Rezidivprävention eines Mammakarzinoms neben generellen Ernährungsempfehlungen und der Einhaltung eines normalen BMIs auch der Verzehr von lignan- und ballaststoffreichen Lebensmitteln (z. B. Leinsamen) als „+“, also als „Intervention mit limitiertem Benefit für Patienten, die durchgeführt werden kann“ empfohlen [12].

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Als häufigster bösartiger Tumor und häufigste Krebstodesursache der Frau hat das Mammakarzinom einen bedeutenden Einfluss auf unsere Gesellschaft. Aufgrund der komplexen und nebenwirkungsreichen konventionellen Therapien wächst die Nachfrage nach schonenderen naturheilkundlichen Alternativen und natürlichen präventiven Optionen. Weltweit erhebliche geographische Unterschiede in der Brustkrebsinzidenz rücken bei dieser Suche zunehmend Umweltfaktoren wie Lebensstil und Ernährung in den Fokus. Ein entscheidender Beitrag zur geringen Rate an Brustkrebs-Neuerkrankungen im asiatischen Raum wird den soja- und damit phytoestrogenreichen Ernährungsgewohnheiten in diesem Kulturkreis zugeschrieben. In der westlichen Gesellschaft spielen Phytoestrogene bisher eine untergeordnete Rolle. Den Großteil an Phytoestrogenen in unserer Ernährungsweise machen Lignane aus. Die Leinpflanze *Linum usitatissimum* stellt mit ihrem hohen Lignananteil, insbesondere in ihren Samen, ein mögliches Pendant des westlichen Kulturkreises zu der Isoflavon-reichen Sojapflanze in Asien dar.

Da Soja und Isoflavone *in-vitro* und *in-vivo* vielversprechende antitumorigene Wirkungen gezeigt haben, beschäftigen sich seit Jahrzehnten zahlreiche Forschungsgruppen auch mit der Frage eines ähnlichen Potenzials von Leinpflanzen-Extrakten und Lignan. Bisher lässt die Studienlage bei einer Vielzahl uneindeutiger Ergebnisse keine Empfehlungen zu. Um herauszufinden, welchen Einfluss Lignane unabhängig von anderen Inhaltsstoffen der Leinpflanzen-Extrakte wie beispielsweise Fettsäuren oder andere Polyphenole auf Zellen der Mamma und des Mammakarzinoms haben, wurde in dieser Arbeit die Wirkung einzelner reiner, häufig vorkommender Lignane (Secoisolariciresinol, Matairesinol, Enterodiol und Enterolacton) untersucht. Ziel war es eine Aussage zu einer möglichen tumorpräventiven oder therapeutischen Wirkung von Lignan in Bezug auf das Mammakarzinom zu treffen. Da Mamma- und Mammakarzinomzellen aufgrund unterschiedlicher Zelltypen, Hormon- und Wachstumsrezeptorexpressionen stark abweichende Verhaltensweisen zeigen betrachteten wir den Effekt der vier Lignane auf verschiedene gut- und bösartige Zellen der humanen Mamma – den benignen Zellen der Linien MCF-12A, den HMEC sowie den bisher wenig untersuchten malignen Hs 578T-Zellen. Nach immunhistochemischer Charakterisierung der Zellen wurden hierzu die Zytotoxizität der Lignane sowie deren Auswirkungen auf die Zellproliferation, den oxidativen Stress, den Glukoseverbrauch sowie den pH-Wert im Überstand *in-vitro* untersucht und mit dem Einfluss der Kontrollsubstanzen 17 β -Estradiol und dem SERM Tamoxifen verglichen.

Auf die maligne ER α - und PR-negative Zelllinie Hs 578T zeigten die Lignane (ENL > END > MATA > SECO) konzentrationsabhängig signifikante antiproliferative Effekte, wirkten ausgenommen von Enterodiol, in nahezu allen Konzentrationen leicht zytotoxisch und reduzierten den oxidativen Stress. Hierbei spielt möglicherweise die Expression des ER β eine entscheidende Rolle.

Die gutartig veränderte ER- und PR-positive Zelllinie MCF-12A wurde durch die Lignane (ENL > END > MATA und z. T. SECO) ebenfalls signifikant in ihrer Proliferation gehemmt, ohne dass sich dabei signifikante proliferative oder zytotoxische Effekte zeigten.

Oxidativer Stress und Zellstoffwechsel veränderten sich bei beiden Zelllinien nicht signifikant. Gleichzeitig beeinflussten die Lignane unveränderte Mammaepithelzellen (HMEC) kaum. Ihre Proliferation wurde unter dem Einfluss der Lignane größtenteils geringfügig und nicht-signifikant gehemmt – ohne dabei eine verstärkte Zellschädigung zu zeigen. Lediglich bei Matairesinol in der geringsten Konzentration kam es zu einer leichten, nicht-signifikanten Proliferationssteigerung. Zudem reduzierten die Lignane den oxidativen Stress der Zellen der Primärkultur zum Teil deutlich.

Die zytotoxische – bei den Zelllinien MCF-12A und Hs 578T auch die antiproliferative – Wirkung der Lignane war im Vergleich zu Tamoxifen signifikant geringer.

Verglichen mit 17 β -Estradiol zeigten die Lignane bei den Linien MCF-12A und Hs 578T in hohen Konzentrationen überwiegend eine signifikant stärkere Proliferationshemmung, weitestgehend ohne signifikanten Unterschied in der Zytotoxizität. Die Primärkultur HMEC blieb durch 17 β -Estradiol ebenfalls nahezu unbeeinflusst.

Bei der großen Diversität des Mammakarzinoms konnten die Erkenntnisse über den Einfluss von Lignanen in dieser Arbeit um weitere gut- und bösartig veränderte Zellen erweitert und deren potenzielle tumorpräventive und -therapeutische Wirkung bei unterschiedlicher Dignität und Rezeptor-Expression von Mamma- und Mammakarzinomzellen bekräftigt werden.

VII. AUSBLICK

Mit der Expression des ER β bietet insbesondere die in der Klinik als triple-negative, mit schlechter Prognose assoziierte Zelllinie Hs 578T das Potenzial eines zusätzlichen therapeutischen Ansatzes. Ob das antitumorigene Potenzial bei der malignen Zelllinie Hs 578T auf die Besonderheit der isolierten ER β -Expression zurückgeführt werden kann, muss an weiteren klinisch triple-negativen aber ER β -positiven Tumoren *in-vitro* untersucht, mit der Wirkung von Zellen ohne Steroidhormonrezeptorexpression verglichen und potenzielle Mammakarzinom-Typen für *in-vivo*-Versuche ausgewählt werden. Gleichzeitig müssen auch Interaktionen mit Estradiol und Tamoxifen mit in die Untersuchungen einbezogen werden, um mögliche synergistische oder antagonistische Wirkungen zu identifizieren. Unter diesem Aspekt wäre auch die Erforschung des Einsatzes von Lignanenen bei Tamoxifen-Resistenz bestimmter Mammakarzinom-Typen denkbar.

Die Lignane auch auf die Linie MCF-12A proliferationshemmend wirkten, könnten Patientinnen mit fibrozystisch veränderter Brust, beispielsweise im Rahmen der häufig vorkommenden Mastopathie, möglicherweise ebenfalls von einer präventiven oder therapeutischen Lignanaufnahme profitieren. Auf die Proliferation oder Zytotoxizität der normalen Mammepithelzellen in dieser Arbeit konnte kein signifikanter Effekt durch die Lignane gezeigt werden. Der oxidative Stress hingegen, welcher eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese spielen kann (siehe Kapitel 5.2.3.1), wurde in den Versuchen dieser Arbeit bei der Primärkultur bei Lignanzugabe zum Teil deutlich reduziert. Somit konnte auch ein präventives Potenzial von Lignanenen bestätigt werden, das durch weitere *in-vitro*-Versuche mit höherer Anzahl und *in-vivo*-Versuche im Anschluss validiert werden muss.

In Zukunft könnten Lignane möglicherweise unter präventiven Aspekten oder im Rahmen einer individualisierten Therapie für bestimmte Mammakarzinom-Typen eingesetzt werden.

VIII. THESEN

1. Das Mammakarzinom ist durch eine histologische und molekulare Diversität gekennzeichnet.
2. Die Brustkrebsinzidenz unterscheidet sich weltweit erheblich.
3. Die Entstehung des Mammakarzinoms ist multifaktoriell bedingt.
4. Verschiedene gutartige Veränderungen der Brust sind mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs assoziiert.
5. Lebensstil und Ernährung haben einen Einfluss auf die Brustkrebsinzidenz.
6. Die Phytoestrogen-Aufnahme in Asien ist im Durchschnitt höher als in westlichen Kulturkreisen, was mit der vergleichsweise niedrigen Brustkrebshäufigkeit in Verbindung gebracht wird.
7. Phytoestrogene können mit Estrogenrezeptoren interagieren und estrogenagonistische / -antagonistische Wirkungen entfalten.
8. Studien zeigen antitumorigene Eigenschaften von Phytoestrogenen *in-vitro* und *in-vivo*.
9. Immunhistochemisch lassen sich bei der Primärkultur HMEC und der benigne veränderten Zelllinie MCF-12A die Estrogenrezeptoren ER α und ER β sowie der Progesteronrezeptor nachweisen, bei der malignen Zelllinie Hs 578T der ER β .
10. Zur Bestimmung der Zellproliferation und Zytotoxizität, des oxidativen Stresses und Zellmetabolismus wurden der LDH- und BrdU-Test verwendet sowie die Messung der H₂O₂-Konzentration, des Glukoseverbrauchs und des pH-Wertes herangezogen.
11. Kommerzielle Lignane (Enterolacton, Enterodiol, Secoisolariciresinol, Matairesinol) wirken auf Mammaepithelzellen unterschiedlicher Dignität und Rezeptorstatus.

12. Kommerzielle Lignane zeigen bei Zugabe zu normalen sowie benigne und maligne veränderten Mammaepithelzellen (HMEC, MCF-12A, Hs 578T) in hohen Konzentrationen antiproliferative Effekte.
13. Die Enterolignane Enterolacton und Enterodiol besitzen eine überwiegend stärkere antiproliferative Wirkung als die pflanzlichen Lignane Secoisolariciresinol und Matairesinol.
14. Kommerzielle Lignane zeigen bei Zugabe zu maligne veränderten Mammaepithelzellen (Hs 578T) teilweise zytotoxische Effekte, bei benignen und unveränderten Mammaepithelzellen (HMEC und MCF-12A) tritt keine signifikante Zellschädigung auf.
15. Die zytotoxische und antiproliferative Wirkung der kommerziellen Lignane ist in den verwendeten Konzentrationen geringer als diejenige des SERMs Tamoxifen.
16. Verglichen mit 17 β -Estradiol zeigen die Lignane in den verwendeten Konzentrationen bei benigne und maligne veränderten Mammaepithelzellen (MCF-12A und Hs 578T) eine überwiegend stärkere Proliferationshemmung, weitestgehend ohne signifikanten Unterschied in der Zytotoxizität.
17. Die Auswirkungen der kommerziellen Lignane auf unveränderte Mammaepithelzellen (HMEC) sind gering ausgeprägt.
18. Kommerziellen Lignane können oxidativen Stress reduzieren.
19. Lignane haben das Potenzial einer tumorpräventiven und -therapeutischen Wirkung in Bezug auf das Mammakarzinom.
20. Insbesondere der Einsatz von Lignanen bei triple-negativen ER β -positiven Mammakarzinomen ist von Interesse und muss durch weitere *in-vitro*- und *in-vivo* Versuchsreihen validiert werden.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Abarzua, S., Serikawa, T., Szewczyk, M., Richter, D.-U., Piechulla, B., and Briese, V. 2012. Antiproliferative activity of lignans against the breast carcinoma cell lines MCF 7 and BT 20. *Archives of gynecology and obstetrics* 285, 4, 1145–1151.
- [2] Adlercreutz, H. 1995. Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environmental health perspectives* 103 Suppl 7, 103–112.
- [3] Adlercreutz, H. 2002. Phyto-oestrogens and cancer. *The Lancet. Oncology* 3, 6, 364–373.
- [4] Adlercreutz, H. 2007. Lignans and human health. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 44, 5-6, 483–525.
- [5] Adlercreutz, H., Bannwart, C., Wähälä, K., Mäkelä, T., Brunow, G., Hase, T., Arosemena, P. J., Kellis, J. T., and Vickery, L. E. 1993. Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 44, 2, 147–153.
- [6] Adlercreutz, H., Höckerstedt, K., Bannwart, C., Bloigu, S., Hämäläinen, E., Fotsis, T., and Ollus, A. 1987. Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). *Journal of Steroid Biochemistry* 27, 4-6, 1135–1144.
- [7] Adolphe, J. L., Whiting, S. J., Juurlink, B. H. J., Thorpe, L. U., and Alcorn, J. 2010. Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *The British journal of nutrition* 103, 7, 929–938.
- [8] Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. B., and Starke, K., Eds. 2017. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- [9] Andersen, Z. J., Jørgensen, J. T., Grøn, R., Brauner, E. V., and Lynge, E. 2017. Active smoking and risk of breast cancer in a Danish nurse cohort study. *BMC cancer* 17, 1, 556.
- [10] Anderson, L. N., Cotterchio, M., Boucher, B. A., and Kreiger, N. 2013. Phytoestrogen intake from foods, during adolescence and adulthood, and risk of breast cancer by estrogen and progesterone receptor tumor subgroup among Ontario women. *International journal of cancer* 132, 7, 1683–1692.

- [11] Antoniou, A., Pharoah, P. D. P., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D. M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., Gronwald, J., Gorski, B., Tulinius, H., Thorlacius, S., Eerola, H., Nevanlinna, H., Syrjäkoski, K., Kallioniemi, O.-P., Thompson, D., Evans, C., Peto, J., Lalloo, F., Evans, D. G., and Easton, D. F. 2003. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *American journal of human genetics* 72, 5, 1117–1130.
- [12] Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie E.V. 2017. *Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit primärem und metastasiertem Brustkrebs*. https://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2018-03/Gesamt_deutsch/Alle_aktuellen_Empfehlungen_2018.pdf. Accessed 14 March 2018.
- [13] ATCC. 2016. *Hs 578T (ATCC® HTB-126™)*. https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-126.aspx?geo_country=de. Accessed 25 January 2018.
- [14] Aune, D., Chan, D. S. M., Greenwood, D. C., Vieira, A. R., Rosenblatt, D. A. N., Vieira, R., and Norat, T. 2012. Dietary fiber and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 23, 6, 1394–1402.
- [15] Aune, D., Chan, D. S. M., Vieira, A. R., Rosenblatt, D. A. N., Vieira, R., Greenwood, D. C., and Norat, T. 2012. Fruits, vegetables and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Breast cancer research and treatment* 134, 2, 479–493.
- [16] Axelson, M. and Setchell, K. D. 1981. The excretion of lignans in rats -- evidence for an intestinal bacterial source for this new group of compounds. *FEBS letters* 123, 2, 337–342.
- [17] Bakken, K., Fournier, A., Lund, E., Waaseth, M., Dumeaux, V., Clavel-Chapelon, F., Fabre, A., Hémon, B., Rinaldi, S., Chajes, V., Slimani, N., Allen, N. E., Reeves, G. K., Bingham, S., Khaw, K.-T., Olsen, A., Tjønneland, A., Rodriguez, L., Sánchez, M.-J., Etxezarreta, P. A., Ardanaz, E., Tormo, M.-J., Peeters, P. H., van Gils, C. H., Steffen, A., Schulz, M., Chang-Claude, J., Kaaks, R., Tumino, R., Gallo, V., Norat, T., Riboli, E., Panico, S., Masala, G., González, C. A., and Berrino, F. 2011. Menopausal hormone therapy and breast cancer risk: impact of different treatments. The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *International journal of cancer* 128, 1, 144–156.

- [18] Baselga, J., Cortés, J., Kim, S.-B., Im, S.-A., Hegg, R., Im, Y.-H., Roman, L., Pedrini, J. L., Pienkowski, T., Knott, A., Clark, E., Benyunes, M. C., Ross, G., and Swain, S. M. 2012. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine* 366, 2, 109–119.
- [19] Bauerfeind, I. 2015. *Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, München.
- [20] Bayrak, A., Kiralan, M., Ipek, A., Arslan, N., Cosge, B., and Khawar, K. M. 2010. Fatty Acid Compositions of Linseed (*Linum Usitatissimum* L.) Genotypes of Different Origin Cultivated in Turkey. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 24, 2, 1836–1842.
- [21] Beral, V., Reeves, G., Bull, D., and Green, J. 2011. Breast cancer risk in relation to the interval between menopause and starting hormone therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 103, 4, 296–305.
- [22] Bergman Jungeström, M., Thompson, L. U., and Dabrosin, C. 2007. Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis, and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts in vivo. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 3, 1061–1067.
- [23] Bhandari, R., Kelley, G. A., Hartley, T. A., and Rockett, I. R. H. 2014. Metabolic syndrome is associated with increased breast cancer risk: a systematic review with meta-analysis. *International journal of breast cancer* 2014, 189384.
- [24] Bilal, I., Chowdhury, A., Davidson, J., and Whitehead, S. 2014. Phytoestrogens and prevention of breast cancer: The contentious debate. *World journal of clinical oncology* 5, 4, 705–712.
- [25] Björnström, L. and Sjöberg, M. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 19, 4, 833–842.
- [26] Boker, L. K., Van der Schouw, Yvonne T, De Kleijn, Miriam J J, Jacques, P. F., Grobbee, D. E., and Peeters, P. H. M. 2002. Intake of dietary phytoestrogens by Dutch women. *The Journal of nutrition* 132, 6, 1319–1328.
- [27] Borriello, S. P., Setchell, K.D.R., Axelson, M., and Lawson, A. M. 1985. Production and metabolism of lignans by the human faecal flora. *Journal of Applied Bacteriology* 58, 1, 37–43.
- [28] Boyan, B. D., Sylvia, V. L., Frambach, T., Lohmann, C. H., Dietl, J., Dean, D. D., and Schwartz, Z. 2003. Estrogen-dependent rapid activation of protein kinase C in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells and estrogen receptor-negative HCC38 cells is membrane-mediated and inhibited by tamoxifen. *Endocrinology* 144, 5, 1812–1824.

- [29] Boyd, N. F., Stone, J., Vogt, K. N., Connelly, B. S., Martin, L. J., and Minkin, S. 2003. Dietary fat and breast cancer risk revisited: a meta-analysis of the published literature. *British journal of cancer* 89, 9, 1672–1685.
- [30] Bozan, B. and Temelli, F. 2008. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresource technology* 99, 14, 6354–6359.
- [31] Brauch, H., Mürdter, T. E., Eichelbaum, M., and Schwab, M. 2009. Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. *Clinical chemistry* 55, 10, 1770–1782.
- [32] Brooks, J. D. and Thompson, L. U. 2005. Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 94, 5, 461–467.
- [33] Buck, K., Zaineddin, A. K., Vrieling, A., Heinz, J., Linseisen, J., Flesch-Janys, D., and Chang-Claude, J. 2011. Estimated enterolignans, lignan-rich foods, and fibre in relation to survival after postmenopausal breast cancer. *British journal of cancer* 105, 8, 1151–1157.
- [34] Buck, K., Zaineddin, A. K., Vrieling, A., Linseisen, J., and Chang-Claude, J. 2010. Meta-analyses of lignans and enterolignans in relation to breast cancer risk. *The American journal of clinical nutrition* 92, 1, 141–153.
- [35] Buckland, G., Travier, N., Cottet, V., González, C. A., Luján-Barroso, L., Agudo, A., Trichopoulou, A., Lagiou, P., Trichopoulos, D., Peeters, P. H., May, A., Bueno-de-Mesquita, H. B., Bvan Duijnhoven, F. J., Key, T. J., Allen, N., Khaw, K. T., Wareham, N., Romieu, I., McCormack, V., Boutron-Ruault, M., Clavel-Chapelon, F., Panico, S., Agnoli, C., Palli, D., Tumino, R., Vineis, P., Amiano, P., Barricarte, A., Rodríguez, L., Sanchez, M. J., Chirlaque, M. D., Kaaks, R., Teucher, B., Boeing, H., Bergmann, M. M., Overvad, K., Dahm, C. C., Tjønneland, A., Olsen, A., Manjer, J., Wirfält, E., Hallmans, G., Johansson, I., Lund, E., Hjartåker, A., Skeie, G., Vergnaud, A. C., Norat, T., Romaguera, D., and Riboli, E. 2013. Adherence to the mediterranean diet and risk of breast cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition cohort study. *International journal of cancer* 132, 12, 2918–2927.
- [36] Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R. J., and Speirs, V. 2003. Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast cancer research : BCR* 5, 2, 111.
- [37] Cameron, D., Piccart-Gebhart, M. J., Gelber, R. D., Procter, M., Goldhirsch, A., Azambuja, E. de, Castro, G., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Al-Sakaff, N., Lauer, S., McFadden, E., Leyland-Jones, B., Bell, R., Dowsett, M., and Jackisch, C. 2017. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer. Final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *The Lancet* 389, 10075, 1195–1205.

- [38] Castelló, A., Boldo, E., Pérez-Gómez, B., Lope, V., Altzibar, J. M., Martín, V., Castaño-Vinyals, G., Guevara, M., Dierssen-Sotos, T., Tardón, A., Moreno, V., Puig-Vives, M., Llorens-Ivorra, C., Alguacil, J., Gómez-Acebo, I., Castilla, J., Gràcia-Lavedán, E., Dávila-Batista, V., Kogevinas, M., Aragonés, N., Amiano, P., and Pollán, M. 2017. Adherence to the Western, Prudent and Mediterranean dietary patterns and breast cancer risk: MCC-Spain study. *Maturitas* 103, 8–15.
- [39] Chang, E. C., Frasor, J., Komm, B., and Katzenellenbogen, B. S. 2006. Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Endocrinology* 147, 10, 4831–4842.
- [40] Chen, J., Hui, E., Ip, T., and Thompson, L. U. 2004. Dietary flaxseed enhances the inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (mcf-7) in nude mice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 22, 7703–7711.
- [41] Chen, J., Stavro, P. M., and Thompson, L. U. 2002. Dietary flaxseed inhibits human breast cancer growth and metastasis and downregulates expression of insulin-like growth factor and epidermal growth factor receptor. *Nutrition and cancer* 43, 2, 187–192.
- [42] Chen, J., Tan, K. P., Ward, W. E., and Thompson, L. U. 2003. Exposure to Flaxseed or Its Purified Lignan during Suckling Inhibits Chemically Induced Rat Mammary Tumorigenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 228, 8, 951–958.
- [43] Chen, M., Rao, Y., Zheng, Y., Wei, S., Li, Y., Guo, T., and Yin, P. 2014. Association between soy isoflavone intake and breast cancer risk for pre- and post-menopausal women: a meta-analysis of epidemiological studies. *PloS one* 9, 2, e89288.
- [44] Chen, M.-N., Lin, C.-C., and Liu, C.-F. 2015. Efficacy of phytoestrogens for menopausal symptoms: a meta-analysis and systematic review. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society* 18, 2, 260–269.
- [45] Chen, X. and Song, E. 2018. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nature reviews. Drug discovery*.
- [46] Chen, Y., Thompson, W., Semenciw, R., and Mao, Y. 1999. Epidemiology of contralateral breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 8, 10, 855–861.
- [47] Chen, Z., Zheng, W., Custer, L. J., Dai, Q., Shu, X. O., Jin, F., and Franke, A. A. 1999. Usual dietary consumption of soy foods and its correlation with the excretion rate of isoflavonoids in overnight urine samples among Chinese women in Shanghai. *Nutrition and cancer* 33, 1, 82–87.

- [48] Chlebowski, R. T., Anderson, G. L., Gass, M., Lane, D. S., Aragaki, A. K., Kuller, L. H., Manson, J. E., Stefanick, M. L., Ockene, J., Sarto, G. E., Johnson, K. C., Wactawski-Wende, J., Ravdin, P. M., Schenken, R., Hendrix, S. L., Rajkovic, A., Rohan, T. E., Yasmeen, S., and Prentice, R. L. 2010. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women. *JAMA* 304, 15, 1684–1692.
- [49] Cibula, D., Gompel, A., Mueck, A. O., La Vecchia, C., Hannaford, P. C., Skouby, S. O., Zikan, M., and Dusek, L. 2010. Hormonal contraception and risk of cancer. *Human reproduction update* 16, 6, 631–650.
- [50] Clark, A. G. and Vignjevic, D. M. 2015. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current opinion in cell biology* 36, 13–22.
- [51] Clarke, R. B., Howell, A., Potten, C. S., and Anderson, E. 1997. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer research* 57, 22, 4987–4991.
- [52] Clavel, T., Henderson, G., Engst, W., Doré, J., and Blaut, M. 2006. Phylogeny of human intestinal bacteria that activate the dietary lignan secoisolariciresinol diglucoside. *FEMS microbiology ecology* 55, 3, 471–478.
- [53] Colditz, G. A., Bohlke, K., and Berkey, C. S. 2014. Breast cancer risk accumulation starts early: prevention must also. *Breast cancer research and treatment* 145, 3, 567–579.
- [54] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 1997. Breast cancer and hormone replacement therapy. Collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52 705 women with breast cancer and 108 411 women without breast cancer. *The Lancet* 350, 9084, 1047–1059.
- [55] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 2002. Alcohol, tobacco and breast cancer—collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *British journal of cancer* 87, 11, 1234–1245.
- [56] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 2002. Breast cancer and breastfeeding. Collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *The Lancet* 360, 9328, 187–195.
- [57] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 2012. Menarche, menopause, and breast cancer risk. Individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *The Lancet Oncology* 13, 11, 1141–1151.

- [58] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer¹. 1996. Breast cancer and hormonal contraceptives. Collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *The Lancet* 347, 9017, 1713–1727.
- [59] Collins, L. C., Baer, H. J., Tamimi, R. M., Connolly, J. L., Colditz, G. A., and Schnitt, S. J. 2007. Magnitude and laterality of breast cancer risk according to histologic type of atypical hyperplasia: results from the Nurses' Health Study. *Cancer* 109, 2, 180–187.
- [60] Cottet, V., Touvier, M., Fournier, A., Touillaud, M. S., Lafay, L., Clavel-Chapelon, F., and Boutron-Ruault, M.-C. 2009. Postmenopausal breast cancer risk and dietary patterns in the E3N-EPIC prospective cohort study. *American Journal of Epidemiology* 170, 10, 1257–1267.
- [61] Cuzick, J., Powles, T., Veronesi, U., Forbes, J., Edwards, R., Ashley, S., and Boyle, P. 2003. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *The Lancet* 361, 9354, 296–300.
- [62] Dabrosin, C., Chen, J., Wang, L., and Thompson, L. U. 2002. Flaxseed inhibits metastasis and decreases extracellular vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts. *Cancer letters* 185, 1, 31–37.
- [63] Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S. A., Jordan, V. C., Katzenellenbogen, J. A., Korach, K. S., Maggi, A., Muramatsu, M., Parker, M. G., and Gustafsson, J.-A. 2006. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacological reviews* 58, 4, 773–781.
- [64] Davies, C., Pan, H., Godwin, J., Gray, R., Arriagada, R., Raina, V., Abraham, M., Alencar, V. H. M., Badran, A., Bonfill, X., Bradbury, J., Clarke, M., Collins, R., Davis, S. R., Delmestri, A., Forbes, J. F., Haddad, P., Hou, M.-F., Inbar, M., Khaled, H., Kielanowska, J., Kwan, W.-H., Mathew, B. S., Mittra, I., Müller, B., Nicolucci, A., Peralta, O., Pernas, F., Petruzelka, L., Pienkowski, T., Radhika, R., Rajan, B., Rubach, M. T., Tort, S., Urrútia, G., Valentini, M., Wang, Y., and Peto, R. 2013. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer. ATLAS, a randomised trial. *The Lancet* 381, 9869, 805–816.
- [65] Deapen, D., Liu, L., Perkins, C., Bernstein, L., and Ross, R. K. 2002. Rapidly rising breast cancer incidence rates among Asian-American women. *International journal of cancer* 99, 5, 747–750.
- [66] Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. 2014. *Sekundäre Pflanzenstoffe und ihre Wirkung auf die Gesundheit. Eine Aktualisierung anhand des Ernährungsberichts 2012*. <https://www.dge.de/wissenschaft/weitere-publikationen/fachinformationen/sekundaere-pflanzenstoffe-und-ihre-wirkung/>. Accessed 17 September 2018.
-

- [67] Deutsche Krebsgesellschaft, Ed. 2016. *Gynäkologische Tumoren*. Urban & Fischer, München.
- [68] Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie), Ed. 2017. *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Version 4.0*.
- [69] Deutsches Konsortium für familiären Brust- und Eierstockkrebs. 2018. *Familiärer Brust- und Eierstockkrebs*. <https://www.konsortium-familiaerer-brustkrebs.de/informationen/familiaerer-brust-und-eierstockkrebs/>. Accessed 21 March 2018.
- [70] Dörbecker, D. 2015. *Der inhibitorische Effekt dreier Leinwurzelreifegrade aus der Klimakammer auf estrogenrezeptorpositive (MCF7) und estrogenrezeptornegative (BT20) Mammakarzinomzellen*. Inauguraldissertation. Universität, Rostock.
- [71] Dumeaux, V., Alsaker, E., and Lund, E. 2003. Breast cancer and specific types of oral contraceptives: a large Norwegian cohort study. *International journal of cancer* 105, 6, 844–850.
- [72] Dunnwald, L. K., Rossing, M. A., and Li, C. I. 2007. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast cancer research : BCR* 9, 1, R6.
- [73] Dünow, A. 2013. *Die kumulative Wirkung von Leinwurzelextrakt der Pflanze *Linum usitatissimum* und Tamoxifen auf östrogenpositive Mammakarzinomzellen*. Inauguraldissertation. Universität Rostock.
- [74] Dupont, W. D., Parl, F. F., Hartmann, W. H., Brinton, L. A., Winfield, A. C., Worrell, J. A., Schuyler, P. A., and Plummer, W. D. 1993. Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. *Cancer* 71, 4, 1258–1265.
- [75] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. 2011. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death. Meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. *The Lancet* 378, 9804, 1707–1716.
- [76] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. 2011. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen. Patient-level meta-analysis of randomised trials. *The Lancet* 378, 9793, 771–784.
- [77] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. 2014. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality. Meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *The Lancet* 383, 9935, 2127–2135.

- [78] Eczko, M. 2015. *Funktionelle und zytotoxische Untersuchungen zur Wirkung eines phytoestrogenhaltigen Wasserextraktes aus der Wurzel von Linum usitatissimum auf humane estrogenrezeptorpositive, -negative Mammakarzinomzellen (MCF-7; BT-20) und humane Hepatozyten*. Inauguraldissertation. Universität Rostock.
- [79] ELSTON, C. W. and ELLIS, I. O. 1991. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer. Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19, 5, 403–410.
- [80] Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. 2013. Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women. A collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *The Lancet Oncology* 14, 10, 1009–1019.
- [81] Esposito, K., Chiodini, P., Capuano, A., Bellastella, G., Maiorino, M. I., Rafaniello, C., and Giugliano, D. 2013. Metabolic syndrome and postmenopausal breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Menopause (New York, N.Y.)* 20, 12, 1301–1309.
- [82] Evans, B. A. J., Griffiths, K., and Morton, M. S. 1995. Inhibition of 5 α -reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *Journal of Endocrinology* 147, 2, 295–302.
- [83] Fabian, C. J., Kimler, B. F., Zalles, C. M., Klemp, J. R., Petroff, B. K., Khan, Q. J., Sharma, P., Setchell, K. D. R., Zhao, X., Phillips, T. A., Metheny, T., Hughes, J. R., Yeh, H.-W., and Johnson, K. A. 2010. Reduction in Ki-67 in benign breast tissue of high-risk women with the lignan secoisolariciresinol diglycoside. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 3, 10, 1342–1350.
- [84] Fox, E. M., Davis, R. J., and Shupnik, M. A. 2008. ER β in breast cancer—Onlooker, passive player, or active protector? *Steroids* 73, 11, 1039–1051.
- [85] Friedenreich, C. M. and Cust, A. E. 2008. Physical activity and breast cancer risk: impact of timing, type and dose of activity and population subgroup effects. *British journal of sports medicine* 42, 8, 636–647.
- [86] Frölich, J. C. and Kirch, W. 2000. *Praktische Arzneitherapie*. Springer Berlin Heidelberg.
- [87] Fulan, H., Changxing, J., Baina, W. Y., Wencui, Z., Chunqing, L., Fan, W., Dandan, L., Dianjun, S., Tong, W., Da, P., and Yashuang, Z. 2011. Retinol, vitamins A, C, and E and breast cancer risk: a meta-analysis and meta-regression. *Cancer causes & control : CCC* 22, 10, 1383–1396.
- [88] Gandini, S., Merzenich, H., Robertson, C., and Boyle, P. 2000. Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet. *European Journal of Cancer* 36, 5, 636–646.

- [89] García-Mateos, D., García-Villalba, R., Otero, J. A., Marañón, J. A., Espín, J. C., Álvarez, A. I., and Merino, G. 2018. An altered tissue distribution of flaxseed lignans and their metabolites in Abcg2 knockout mice. *Food & function*.
- [90] Gaudet, M. M., Gapstur, S. M., Sun, J., Diver, W. R., Hannan, L. M., and Thun, M. J. 2013. Active smoking and breast cancer risk: original cohort data and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 105, 8, 515–525.
- [91] Giangrande, P. H., Pollio, G., and McDonnell, D. P. 1997. Mapping and Characterization of the Functional Domains Responsible for the Differential Activity of the A and B Isoforms of the Human Progesterone Receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 52, 32889–32900.
- [92] Gianni, L., Eiermann, W., Semiglazov, V., Lluch, A., Tjulandin, S., Zambetti, M., Moliterni, A., Vazquez, F., Byakhov, M. J., Lichinitser, M., Climent, M. A., Ciruelos, E., Ojeda, B., Mansutti, M., Bozhok, A., Magazzù, D., Heinzmann, D., Steinseifer, J., Valagussa, P., and Baselga, J. 2014. Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH). Follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *The Lancet Oncology* 15, 6, 640–647.
- [93] Gianni, L., Eiermann, W., Semiglazov, V., Manikhas, A., Lluch, A., Tjulandin, S., Zambetti, M., Vazquez, F., Byakhov, M., Lichinitser, M., Climent, M. A., Ciruelos, E., Ojeda, B., Mansutti, M., Bozhok, A., Baronio, R., Feyereislova, A., Barton, C., Valagussa, P., and Baselga, J. 2010. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial). A randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *The Lancet* 375, 9712, 377–384.
- [94] Gianni, L., Pienkowski, T., Im, Y.-H., Roman, L., Tseng, L.-M., Liu, M.-C., Lluch, A., Staroslawska, E., La Haba-Rodriguez, J. de, Im, S.-A., Pedrini, J. L., Poirier, B., Morandi, P., Semiglazov, V., Srimuninnimit, V., Bianchi, G., Szado, T., Ratnayake, J., Ross, G., and Valagussa, P. 2012. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere). A randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 13, 1, 25–32.
- [95] Gierisch, J. M., Coeytaux, R. R., Urrutia, R. P., Havrilesky, L. J., Moorman, P. G., Lowery, W. J., Dinan, M., McBroom, A. J., Hasselblad, V., Sanders, G. D., and Myers, E. R. 2013. Oral contraceptive use and risk of breast, cervical, colorectal, and endometrial cancers: a systematic review. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 22, 11, 1931–1943.

- [96] Goldhirsch, A., Winer, E. P., Coates, A. S., Gelber, R. D., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., and Senn, H.-J. 2013. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 24, 9, 2206–2223.
- [97] Gray, R. G., Rea, D., Handley, K., Bowden, S. J., Perry, P., Earl, H. M., Poole, C. J., Bates, T., Chetiyawardana, S., Dewar, J. A., Fernando, I. N., Grieve, R., Nicoll, J., Rayter, Z., Robinson, A., Salman, A., Yarnold, J., Bathers, S., Marshall, A., and Lee, M. 2013. aTTom. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years in 6,953 women with early breast cancer. *JCO* 31, 18_suppl, 5.
- [98] Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., and Huber, J. C. 2002. Production and actions of estrogens. *The New England journal of medicine* 346, 5, 340–352.
- [99] Gstraunthaler, G. and Lindl, T. 2013. *Zell- und Gewebekultur. Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, s.l.
- [100] Hackett, A. J., Smith, H. S., Springer, E. L., Owens, R. B., Nelson-Rees, W. A., Riggs, J. L., and Gardner, M. B. 1977. Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 58, 6, 1795–1806.
- [101] Hahn, J.-M. 2018. *Checkliste Innere Medizin*. Checklisten der aktuellen Medizin. Thieme, Stuttgart, New York.
- [102] Haldosén, L.-A., Zhao, C., and Dahlman-Wright, K. 2014. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology* 382, 1, 665–672.
- [103] Hall, J. M., Couse, J. F., and Korach, K. S. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 276, 40, 36869–36872.
- [104] Hannaford, P. C., Selvaraj, S., Elliott, A. M., Angus, V., Iversen, L., and Lee, A. J. 2007. Cancer risk among users of oral contraceptives: cohort data from the Royal College of General Practitioner's oral contraception study. *BMJ (Clinical research ed.)* 335, 7621, 651.
- [105] Hänsel, R., Sticher, O., and Steinegger, E. 2010. *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. Springer-Lehrbuch. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [106] Hartman, J., Lindberg, K., Morani, A., Inzunza, J., Ström, A., and Gustafsson, J.-A. 2006. Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts. *Cancer research* 66, 23, 11207–11213.

- [107] Hartmann, L. C., Sellers, T. A., Frost, M. H., Lingle, W. L., Degnim, A. C., Ghosh, K., Vierkant, R. A., Maloney, S. D., Pankratz, V. S., Hillman, D. W., Suman, V. J., Johnson, J., Blake, C., Tlsty, T., Vachon, C. M., Melton, L. J., and Visscher, D. W. 2005. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *The New England journal of medicine* 353, 3, 229–237.
- [108] Hein, S. 2014. *Stimulation von humanen Karzinomzelllinien des Endometriums mit Leinsamenrohextrakt, Lignanen sowie deren Metaboliten und der Effekt auf das Wachstumsverhalten und die Zytotoxizität*. Inauguraldissertation. Universität Rostock.
- [109] Heinonen, S., Nurmi, T., Liukkonen, K., Poutanen, K., Wähälä, K., Deyama, T., Nishibe, S., and Adlercreutz, H. 2001. In Vitro Metabolism of Plant Lignans. New Precursors of Mammalian Lignans Enterolactone and Enterodiol. *J. Agric. Food Chem.* 49, 7, 3178–3186.
- [110] Henderson, B. E. and Feigelson, H. S. 2000. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 3, 427–433.
- [111] Henderson, T. O., Amsterdam, A., Bhatia, S., Hudson, M. M., Meadows, A. T., Neglia, J. P., Diller, L. R., Constine, L. S., Smith, R. A., Mahoney, M. C., Morris, E. A., Montgomery, L. L., Landier, W., Smith, S. M., Robison, L. L., and Oeffinger, K. C. 2010. Systematic review: surveillance for breast cancer in women treated with chest radiation for childhood, adolescent, or young adult cancer. *Annals of internal medicine* 152, 7, 444-55; W144-54.
- [112] Hinsche, O., Girgert, R., Emons, G., and Gründker, C. 2015. Estrogen receptor β selective agonists reduce invasiveness of triple-negative breast cancer cells. *International journal of oncology* 46, 2, 878–884.
- [113] Horneber, M., Bueschel, G., Dennert, G., Less, D., Ritter, E., and Zwahlen, M. 2012. How many cancer patients use complementary and alternative medicine: a systematic review and metaanalysis. *Integrative cancer therapies* 11, 3, 187–203.
- [114] Howard, B. A. and Lu, P. 2014. Stromal regulation of embryonic and postnatal mammary epithelial development and differentiation. *Seminars in cell & developmental biology* 25-26, 43–51.
- [115] Howe, G. R., Hirohata, T., Hislop, T. G., Iscovich, J. M., Yuan, J.-M., Katsouyanni, K., Lubin, F., Marubini, E., Modan, B., Rohan, T., Toniolo, P., and Shunzhang, Y. 1990. Dietary Factors and Risk of Breast Cancer. Combined Analysis of 12 Case--Control Studies. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 82, 7, 561–569.
- [116] Huang, B., Omoto, Y., Iwase, H., Yamashita, H., Toyama, T., Coombes, R. C., Filipovic, A., Warner, M., and Gustafsson, J.-Å. 2014. Differential expression of estrogen receptor α , $\beta 1$, and $\beta 2$ in lobular and ductal breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 5, 1933–1938.
-

- [117] Hughes, L., Malone, C., Chumsri, S., Burger, A. M., and McDonnell, S. 2008. Characterisation of breast cancer cell lines and establishment of a novel isogenic subclone to study migration, invasion and tumourigenicity. *Clinical & experimental metastasis* 25, 5, 549–557.
- [118] IACR Monographs. 2018. *Agents classified by the IACR Monographs, Volume 1-122*. <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>. Accessed 17 September 2018.
- [119] International Agency for Research On Cancer. 2015. *Breast Cancer. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Accessed 19 March 2018.
- [120] International Agency for Research On Cancer. 2016. *Cancer Fact Sheets: Breast Cancer*. <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers?cancer=15&type=0&sex=2>. Accessed 12 March 2018.
- [121] Iversen, L., Sivasubramaniam, S., Lee, A. J., Fielding, S., and Hannaford, P. C. 2017. Lifetime cancer risk and combined oral contraceptives: the Royal College of General Practitioners' Oral Contraception Study. *American journal of obstetrics and gynecology* 216, 6, 580.
- [122] Iwasaki, M., Hamada, G. S., Nishimoto, I. N., Netto, M. M., Motola, J., Laginha, F. M., Kasuga, Y., Yokoyama, S., Onuma, H., Nishimura, H., Kusama, R., Kobayashi, M., Ishihara, J., Yamamoto, S., Hanaoka, T., and Tsugane, S. 2009. Dietary isoflavone intake and breast cancer risk in case-control studies in Japanese, Japanese Brazilians, and non-Japanese Brazilians. *Breast cancer research and treatment* 116, 2, 401–411.
- [123] Jang, E. R., Lim, S.-J., Lee, E. S., Jeong, G., Kim, T.-Y., Bang, Y.-J., and Lee, J.-S. 2004. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A sensitizes estrogen receptor alpha-negative breast cancer cells to tamoxifen. *Oncogene* 23, 9, 1724–1736.
- [124] Jemal, A., Center, M. M., DeSantis, C., and Ward, E. M. 2010. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 19, 8, 1893–1907.
- [125] Jiang, W., Zhu, Z., McGinley, J. N., El Bayoumy, K., Manni, A., and Thompson, H. J. 2012. Identification of a molecular signature underlying inhibition of mammary carcinoma growth by dietary N-3 fatty acids. *Cancer research* 72, 15, 3795–3806.
- [126] Johnson, M. D., Zuo, H., Lee, K.-H., Trebley, J. P., Rae, J. M., Weatherman, R. V., Desta, Z., Flockhart, D. A., and Skaar, T. C. 2004. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast cancer research and treatment* 85, 2, 151–159.

- [127] Kaaks, R., Rinaldi, S., Key, T. J., Berrino, F., Peeters, P. H. M., Biessy, C., Dossus, L., Lukanova, A., Bingham, S., Khaw, K.-T., Allen, N. E., Bueno-de-Mesquita, H. B., van Gils, C. H., Grobbee, D., Boeing, H., Lahmann, P. H., Nagel, G., Chang-Claude, J., Clavel-Chapelon, F., Fournier, A., Thiébaud, A., González, C. A., Quirós, J. R., Tormo, M.-J., Ardanaz, E., Amiano, P., Krogh, V., Palli, D., Panico, S., Tumino, R., Vineis, P., Trichopoulou, A., Kalapothaki, V., Trichopoulos, D., Ferrari, P., Norat, T., Saracci, R., and Riboli, E. 2005. Postmenopausal serum androgens, oestrogens and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Endocrine-related cancer* 12, 4, 1071–1082.
- [128] Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., and Chambon, P. 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO journal* 9, 5, 1603–1614.
- [129] Key, J., Hodgson, S., Omar, R. Z., Jensen, T. K., Thompson, S. G., Boobis, A. R., Davies, D. S., and Elliott, P. 2006. Meta-analysis of studies of alcohol and breast cancer with consideration of the methodological issues. *Cancer causes & control : CCC* 17, 6, 759–770.
- [130] Key, T. J., Appleby, P. N., Reeves, G. K., Roddam, A. W., Helzlsouer, K. J., Alberg, A. J., Rollison, D. E., Dorgan, J. F., Brinton, L. A., Overvad, K., Kaaks, R., Trichopoulou, A., Clavel-Chapelon, F., Panico, S., Duell, E. J., Peeters, P. H. M., Rinaldi, S., Fentiman, I. S., Dowsett, M., Manjer, J., Lenner, P., Hallmans, G., Baglietto, L., English, D. R., Giles, G. G., Hopper, J. L., Severi, G., Morris, H. A., Hankinson, S. E., Tworoger, S. S., Koenig, K., Zeleniuch-Jacquotte, A., Arslan, A. A., Toniolo, P., Shore, R. E., Krogh, V., Micheli, A., Berrino, F., Barrett-Connor, E., Laughlin, G. A., Kabuto, M., Akiba, S., Stevens, R. G., Neriishi, K., Land, C. E., Cauley, J. A., Lui, L. Y., Cummings, S. R., Gunter, M. J., Rohan, T. E., and Strickler, H. D. 2011. Circulating sex hormones and breast cancer risk factors in postmenopausal women: reanalysis of 13 studies. *British journal of cancer* 105, 5, 709–722.
- [131] Kilkkinen, A. 2002. Use of Oral Antimicrobials Decreases Serum Enterolactone Concentration. *American Journal of Epidemiology* 155, 5, 472–477.
- [132] Kilkkinen, A., Stumpf, K., Pietinen, P., Valsta, L. M., Tapanainen, H., and Adlercreutz, H. 2001. Determinants of serum enterolactone concentration. *The American journal of clinical nutrition* 73, 6, 1094–1100.
- [133] Kim, J.-Y., Park, H. D., Park, E., Chon, J.-W., and Park, Y. K. 2009. Growth-inhibitory and proapoptotic effects of alpha-linolenic acid on estrogen-positive breast cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1171, 190–195.
-

- [134] Kim, Y. and Je, Y. 2014. Vitamin D intake, blood 25(OH)D levels, and breast cancer risk or mortality: a meta-analysis. *British journal of cancer* 110, 11, 2772–2784.
- [135] Kitts, D. D., Yuan, Y. V., Wijewickreme, A. N., and Thompson, L. U. 1999. Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. *Molecular and Cellular Biochemistry* 202, 1/2, 91–100.
- [136] Kleijn, M. J. de, van der Schouw, Y T, Wilson, P. W., Adlercreutz, H., Mazur, W., Grobbee, D. E., and Jacques, P. F. 2001. Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the Framingham study(1-4). *The Journal of nutrition* 131, 6, 1826–1832.
- [137] Kommission Mamma der AGO e.V., Ed. 2011. *Aktuelle Empfehlungen zur Prävention, Diagnostik und Therapie primärer und fortgeschrittener Mammakarzinome. State of the Art*. Zuckschwerdt, Germering, Oberbayern.
- [138] Kommission Mamma der AGO e.V., Ed. 2017. *Brustkrebs. Patientenratgeber zu den AGO-Empfehlungen 2017*. Zuckschwerdt, Germering, Oberbayern.
- [139] Korde, L. A., Wu, A. H., Fears, T., Nomura, A. M. Y., West, D. W., Kolonel, L. N., Pike, M. C., Hoover, R. N., and Ziegler, R. G. 2009. Childhood soy intake and breast cancer risk in Asian American women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18, 4, 1050–1059.
- [140] Kroemer, G. and Pouyssegur, J. 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer cell* 13, 6, 472–482.
- [141] Kyrø, C., Hansen, L., Frederiksen, K., Nørskov, N. P., Bach Knudsen, K. E., Eriksen, A. K., Holm, M., Tjønneland, A., and Olsen, A. 2017. Pre-diagnostic plasma enterolactone concentrations and breast cancer prognosis among postmenopausal women - The Danish Diet, Cancer and Health cohort. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*.
- [142] Lahmann, P. H., Hoffmann, K., Allen, N., van Gils, C. H., Khaw, K.-T., Tehard, B., Ber-rino, F., Tjønneland, A., Bigaard, J., Olsen, A., Overvad, K., Clavel-Chapelon, F., Nagel, G., Boeing, H., Trichopoulos, D., Economou, G., Bellos, G., Palli, D., Tumino, R., Panico, S., Sacerdote, C., Krogh, V., Peeters, P. H. M., Bueno-de-Mesquita, H. B., Lund, E., Ardanaz, E., Amiano, P., Pera, G., Quirós, J. R., Martínez, C., Tormo, M. J., Wirfält, E., Berglund, G., Hallmans, G., Key, T. J., Reeves, G., Bingham, S., Norat, T., Biessy, C., Kaaks, R., and Riboli, E. 2004. Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *International journal of cancer* 111, 5, 762–771.
- [143] Lakhani, S. R. 2014. *WHO Classification of Tumours of the Breast*. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

- [144] Lamartiniere, C. A. 2000. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *The American journal of clinical nutrition* 71, 6 Suppl, 1705S-7S; discussion 1708S-9S.
- [145] Landete, J. M. 2012. Plant and mammalian lignans. A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Research International* 46, 1, 410–424.
- [146] Larsson, S. C., Mantzoros, C. S., and Wolk, A. 2007. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *International journal of cancer* 121, 4, 856–862.
- [147] Lazennec, G., Bresson, D., Lucas, A., Chauveau, C., and Vignon, F. 2001. ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology* 142, 9, 4120–4130.
- [148] Le Scodan, R., Stevens, D., Brain, E., Floiras, J. L., Cohen-Solal, C., La Lande, B. de, Tubiana-Hulin, M., Yacoub, S., Gutierrez, M., Ali, D., Gardner, M., Moisson, P., Villette, S., Lerebours, F., Munck, J. N., and Labib, A. 2009. Breast cancer with synchronous metastases: survival impact of exclusive locoregional radiotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 9, 1375–1381.
- [149] Lee, S.-A., Shu, X.-O., Li, H., Yang, G., Cai, H., Wen, W., Ji, B.-T., Gao, J., Gao, Y.-T., and Zheng, W. 2009. Adolescent and adult soy food intake and breast cancer risk: results from the Shanghai Women's Health Study. *The American journal of clinical nutrition* 89, 6, 1920–1926.
- [150] Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., and Pietenpol, J. A. 2011. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation* 121, 7, 2750–2767.
- [151] Leidenberger, F. A., Strowitzki, T., and Ortmann, O., Eds. 2014. *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte. Mit 204 Abbildungen*. Springer, Heidelberg.
- [152] Lewis, J. E., Nickell, L. A., Thompson, L. U., Szalai, J. P., Kiss, A., and Hilditch, J. R. 2006. A randomized controlled trial of the effect of dietary soy and flaxseed muffins on quality of life and hot flashes during menopause. *Menopause (New York, N.Y.)* 13, 4, 631–642.
- [153] Li, C. I., Malone, K. E., Saltzman, B. S., and Daling, J. R. 2006. Risk of invasive breast carcinoma among women diagnosed with ductal carcinoma in situ and lobular carcinoma in situ, 1988-2001. *Cancer* 106, 10, 2104–2112.
- [154] Liehr, J. G. 2001. Genotoxicity of the steroidal oestrogens oestrone and oestradiol. Possible mechanism of uterine and mammary cancer development. *APMIS* 109, S103, S519-S527.
-

- [155] Lim, Y. C., Desta, Z., Flockhart, D. A., and Skaar, T. C. 2005. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 55, 5, 471–478.
- [156] Limer, J. L. and Speirs, V. 2004. Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. *Breast cancer research : BCR* 6, 3, 119–127.
- [157] Lindberg, K., Helguero, L. A., Omoto, Y., Gustafsson, J.-Å., and Haldosén, L.-A. 2011. Estrogen receptor β represses Akt signaling in breast cancer cells via downregulation of HER2/HER3 and upregulation of PTEN: implications for tamoxifen sensitivity. *Breast cancer research : BCR* 13, 2, R43.
- [158] Liu, C.-Y., Hung, M.-H., Wang, D.-S., Chu, P.-Y., Su, J.-C., Teng, T.-H., Huang, C.-T., Chao, T.-T., Wang, C.-Y., Shiau, C.-W., Tseng, L.-M., and Chen, K.-F. 2014. Tamoxifen induces apoptosis through cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A-dependent phospho-Akt inactivation in estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Breast cancer research : BCR* 16, 5, 431.
- [159] Liu, J. and Ma, D. W. L. 2014. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of breast cancer. *Nutrients* 6, 11, 5184–5223.
- [160] London, S. J. 1992. A Prospective Study of Benign Breast Disease and the Risk of Breast Cancer. *JAMA* 267, 7, 941.
- [161] López-Biedma, A., Sánchez-Quesada, C., Beltrán, G., Delgado-Rodríguez, M., and Gaforio, J. J. 2016. Phytoestrogen (+)-pinorexinol exerts antitumor activity in breast cancer cells with different oestrogen receptor statuses. *BMC complementary and alternative medicine* 16, 350.
- [162] Lüllmann-Rauch, R. 2015. *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [163] Lundholt, B. K., Scudder, K. M., and Pagliaro, L. 2003. A simple technique for reducing edge effect in cell-based assays. *Journal of biomolecular screening* 8, 5, 566–570.
- [164] Lynch, B. M., Neilson, H. K., and Friedenreich, C. M. 2011. Physical activity and breast cancer prevention. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* 186, 13–42.
- [165] MacLennan, M. B., Clarke, S. E., Perez, K., Wood, G. A., Muller, W. J., Kang, J. X., and Ma, D. W. L. 2013. Mammary tumor development is directly inhibited by lifelong n-3 polyunsaturated fatty acids. *The Journal of nutritional biochemistry* 24, 1, 388–395.
- [166] Mali, A. V., Joshi, A. A., Hegde, M. V., and Kadam, S. S. 2018. Enterolactone modulates the ERK/NF- κ B/Snail signaling pathway in triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 to revert the TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition. *Cancer biology & medicine* 15, 2, 137–156.
-

- [167] Mali, A. V., Wagh, U. V., Hegde, M. V., Chandorkar, S. S., Surve, S. V., and Patole, M. V. 2012. In vitro anti-metastatic activity of enterolactone, a mammalian lignan derived from flax lignan, and down-regulation of matrix metalloproteinases in MCF-7 and MDA MB 231 cell lines. *Indian journal of cancer* 49, 1, 181–187.
- [168] Malins, D. C. and Haimanot, R. 1991. Major alterations in the nucleotide structure of DNA in cancer of the female breast. *Cancer research* 51, 19, 5430–5432.
- [169] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* 79, 5, 727–747.
- [170] Manna, S. and Holz, M. K. 2016. Tamoxifen Action in ER-Negative Breast Cancer. *Signal transduction insights* 5, 1–7.
- [171] Marchbanks, P. A., McDonald, J. A., Wilson, H. G., Folger, S. G., Mandel, M. G., Daling, J. R., Bernstein, L., Malone, K. E., Ursin, G., Strom, B. L., Norman, S. A., Wingo, P. A., Burkman, R. T., Berlin, J. A., Simon, M. S., Spirtas, R., and Weiss, L. K. 2002. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *The New England journal of medicine* 346, 26, 2025–2032.
- [172] Marty, M., Cognetti, F., Maraninchi, D., Snyder, R., Mauriac, L., Tubiana-Hulin, M., Chan, S., Grimes, D., Antón, A., Lluch, A., Kennedy, J., O'Byrne, K., Conte, P., Green, M., Ward, C., Mayne, K., and Extra, J.-M. 2005. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 19, 4265–4274.
- [173] Matthews, J., Wihlén, B., Tujague, M., Wan, J., Ström, A., and Gustafsson, J.-A. 2006. Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha-mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen-responsive promoters. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 20, 3, 534–543.
- [174] McCann, S. E., Thompson, L. U., Nie, J., Dorn, J., Trevisan, M., Shields, P. G., Ambrosone, C. B., Edge, S. B., Li, H.-F., Kasprzak, C., and Freudenheim, J. L. 2010. Dietary lignan intakes in relation to survival among women with breast cancer: the Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) Study. *Breast cancer research and treatment* 122, 1, 229–235.
- [175] McCormack, V. A. and dos Santos Silva, I. 2006. Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 15, 6, 1159–1169.
-

- [176] Meindl, A., Hellebrand, H., Wiek, C., Erven, V., Wappenschmidt, B., Niederacher, D., Freund, M., Lichtner, P., Hartmann, L., Schaal, H., Ramser, J., Honisch, E., Kubisch, C., Wichmann, H. E., Kast, K., Deissler, H., Engel, C., Müller-Myhsok, B., Neveling, K., Kiechle, M., Mathew, C. G., Schindler, D., Schmutzler, R. K., and Hanenberg, H. 2010. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nature genetics* 42, 5, 410–414.
- [177] Micke, O., Bruns, F., Glatzel, M., Schönekaes, K., Micke, P., Mücke, R., and Büntzel, J. 2009. Predictive factors for the use of complementary and alternative medicine (CAM) in radiation oncology. *European Journal of Integrative Medicine* 1, 1, 19–25.
- [178] Milder, I. E. J., Arts, I. C. W., van de Putte, B., Venema, D. P., and Hollman, P. C. H. 2005. Lignan contents of Dutch plant foods. A database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *BJN* 93, 03, 393.
- [179] Miller, K., Wang, M., Gralow, J., Dickler, M., Cobleigh, M., Perez, E. A., Shenkier, T., Cella, D., and Davidson, N. E. 2007. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine* 357, 26, 2666–2676.
- [180] Million Women Study Collaborators. 2003. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *The Lancet* 362, 9382, 419–427.
- [181] Minckwitz, G. von, Eidtmann, H., Rezai, M., Fasching, P. A., Tesch, H., Eggemann, H., Schrader, I., Kittel, K., Hanusch, C., Kreienberg, R., Solbach, C., Gerber, B., Jackisch, C., Kunz, G., Blohmer, J.-U., Huober, J., Hauschild, M., Fehm, T., Müller, B. M., Denkert, C., Loibl, S., Nekljudova, V., and Untch, M. 2012. Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer. *The New England journal of medicine* 366, 4, 299–309.
- [182] Mobley, J. A. and Brueggemeier, R. W. 2004. Estrogen receptor-mediated regulation of oxidative stress and DNA damage in breast cancer. *Carcinogenesis* 25, 1, 3–9.
- [183] Montano, M. M., Jaiswal, A. K., and Katzenellenbogen, B. S. 1998. Transcriptional Regulation of the Human Quinone Reductase Gene by Antiestrogen-liganded Estrogen Receptor- α and Estrogen Receptor- β . *J. Biol. Chem.* 273, 39, 25443–25449.
- [184] Montano, M. M. and Katzenellenbogen, B. S. 1997. The quinone reductase gene: A unique estrogen receptor-regulated gene that is activated by antiestrogens. *Endocrinology* 94, 6, 2581–2586.
- [185] Mørch, L. S., Skovlund, C. W., Hannaford, P. C., Iversen, L., Fielding, S., and Lidegaard, Ø. 2017. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. *The New England journal of medicine* 377, 23, 2228–2239.
-

- [186] Moreira, L., Araújo, I., Costa, T., Correia-Branco, A., Faria, A., Martel, F., and Keating, E. 2013. Quercetin and epigallocatechin gallate inhibit glucose uptake and metabolism by breast cancer cells by an estrogen receptor-independent mechanism. *Experimental cell research* 319, 12, 1784–1795.
- [187] Morris, K. T., Johnson, N., Homer, L., and Walts, D. 2000. A comparison of complementary therapy use between breast cancer patients and patients with other primary tumor sites. *The American Journal of Surgery* 179, 5, 407–411.
- [188] Morton, M. S., Wilcox, G., Wahlqvist, M. L., and Griffiths, K. 1994. Determination of lignans and isoflavonoids in human female plasma following dietary supplementation. *Journal of Endocrinology* 142, 2, 251–259.
- [189] Moskowitz, C. S., Chou, J. F., Wolden, S. L., Bernstein, J. L., Malhotra, J., Novetsky Friedman, D., Mubdi, N. Z., Leisenring, W. M., Stovall, M., Hammond, S., Smith, S. A., Henderson, T. O., Boice, J. D., Hudson, M. M., Diller, L. R., Bhatia, S., Kenney, L. B., Neglia, J. P., Begg, C. B., Robison, L. L., and Oeffinger, K. C. 2014. Breast cancer after chest radiation therapy for childhood cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32, 21, 2217–2223.
- [190] Mousavi, Y. and Adlercreutz, H. 1992. Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 41, 3-8, 615–619.
- [191] Mueller, S. O., Simon, S., Chae, K., Metzler, M., and Korach, K. S. 2004. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 80, 1, 14–25.
- [192] Murkies, A. L., Wilcox, G., and Davis, S. R. 1998. Clinical review 92: Phytoestrogens. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83, 2, 297–303.
- [193] NAHLEH, Z. and TABBARA, I. A. 2003. Complementary and alternative medicine in breast cancer patients. *PAX* 1, 03, 136.
- [194] Nass, N. and Kalinski, T. 2015. Tamoxifen resistance: from cell culture experiments towards novel biomarkers. *Pathology, research and practice* 211, 3, 189–197.
- [195] National Cancer Institute at the National Institutes of Health. 2017. *The Genetics of Cancer*. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics>. Accessed 16 September 2018.
- [196] Neuhouser, M. L., Aragaki, A. K., Prentice, R. L., Manson, J. E., Chlebowski, R., Carty, C. L., Ochs-Balcom, H. M., Thomson, C. A., Caan, B. J., Tinker, L. F., Urrutia, R. P., Knudtson, J., and Anderson, G. L. 2015. Overweight, Obesity, and Postmenopausal Invasive Breast Cancer Risk: A Secondary Analysis of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials. *JAMA oncology* 1, 5, 611–621.
-

- [197] Niemeyer, H. B. and Metzler, M. 2003. Differences in the antioxidant activity of plant and mammalian lignans. *Journal of Food Engineering* 56, 2-3, 255–256.
- [198] Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, J. A. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiological reviews* 81, 4, 1535–1565.
- [199] Oh, H., Eliassen, A. H., Wang, M., Smith-Warner, S. A., Beck, A. H., Schnitt, S. J., Collins, L. C., Connolly, J. L., Montaser-Kouhsari, L., Polyak, K., and Tamimi, R. M. 2016. Expression of estrogen receptor, progesterone receptor, and Ki67 in normal breast tissue in relation to subsequent risk of breast cancer. *NPJ breast cancer* 2.
- [200] Olsen, A., Christensen, J., Knudsen, K. E. B., Johnsen, N. F., Overvad, K., and Tjønneland, A. 2011. Prediagnostic plasma enterolactone levels and mortality among women with breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 128, 3, 883–889.
- [201] Oppermann, C. 2013. *Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe für die Krebsprävention und –therapie*. Dissertation. Universität Rostock.
- [202] Osborne, C. K., Hobbs, K., and Trent, J. M. 1987. Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Res Tr* 9, 2, 111–121.
- [203] Page, D. L., Dupont, W. D., Rogers, L. W., and Rados, M. S. 1985. Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study. *Cancer* 55, 11, 2698–2708.
- [204] Paine, T. M., Soule, H. D., Pauley, R. J., and Dawson, P. J. 1992. Characterization of epithelial phenotypes in mortal and immortal human breast cells. *International journal of cancer* 50, 3, 463–473.
- [205] Palmieri, C., Cheng, G. J., Saji, S., Zelada-Hedman, M., Wärr, A., Weihua, Z., van Noorden, S., Wahlstrom, T., Coombes, R. C., Warner, M., and Gustafsson, J.-A. 2002. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocrine-related cancer* 9, 1, 1–13.
- [206] Paruthiyil, S., Parmar, H., Kerekatte, V., Cunha, G. R., Firestone, G. L., and Leitman, D. C. 2004. Estrogen Receptor β Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation and Tumor Formation by Causing a G 2 Cell Cycle Arrest. *Cancer research* 64, 1, 423–428.
- [207] Peñalvo, J. L., Heinonen, S.-M., Aura, A.-M., and Adlercreutz, H. 2005. Dietary sesamin is converted to enterolactone in humans. *The Journal of nutrition* 135, 5, 1056–1062.

- [208] Perez, E. A., Romond, E. H., Suman, V. J., Jeong, J.-H., Davidson, N. E., Geyer, C. E., Martino, S., Mamounas, E. P., Kaufman, P. A., and Wolmark, N. 2011. Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 25, 3366–3373.
- [209] Pettersson, K. and Gustafsson, J. A. 2001. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annual review of physiology* 63, 165–192.
- [210] Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., Cameron, D., Dowsett, M., Barrios, C. H., Steger, G., Huang, C.-S., Andersson, M., Inbar, M., Lichinitser, M., Láng, I., Nitz, U., Iwata, H., Thomssen, C., Lohrisch, C., Suter, T. M., Rüschoff, J., Suto, T., Grotzer, V., Ward, C., Straehle, C., McFadden, E., Dolci, M. S., and Gelber, R. D. 2005. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine* 353, 16, 1659–1672.
- [211] Poly-Optik GmbH. *Zählnetzsysteme- Bürker*. <http://www.poly-optik.de/poly/inhalt/zellenzaehlkammern/zaehlnetzsysteme/zaehl.htm>. Accessed 13 September 2018.
- [212] Porter, P. 2008. "Westernizing" women's risks? Breast cancer in lower-income countries. *The New England journal of medicine* 358, 3, 213–216.
- [213] Power, K. A., Saarinen, N. M., Chen, J. M., and Thompson, L. U. 2006. Mammalian lignans enterolactone and enterodiol, alone and in combination with the isoflavone genistein, do not promote the growth of MCF-7 xenografts in ovariectomized athymic nude mice. *International journal of cancer* 118, 5, 1316–1320.
- [214] Prasad, K. 2000. Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside-derived metabolites, secoisolariciresinol, Enterodiol, and enterolactone. *International Journal of Angiology* 9, 4, 220–225.
- [215] Prentice, R. L., Caan, B., Chlebowski, R. T., Patterson, R., Kuller, L. H., Ockene, J. K., Margolis, K. L., Limacher, M. C., Manson, J. E., Parker, L. M., Paskett, E., Phillips, L., Robbins, J., Rossouw, J. E., Sarto, G. E., Shikany, J. M., Stefanick, M. L., Thomson, C. A., van Horn, L., Vitolins, M. Z., Wactawski-Wende, J., Wallace, R. B., Wassertheil-Smoller, S., Whitlock, E., Yano, K., Adams-Campbell, L., Anderson, G. L., Assaf, A. R., Beresford, S. A. A., Black, H. R., Brunner, R. L., Brzyski, R. G., Ford, L., Gass, M., Hays, J., Heber, D., Heiss, G., Hendrix, S. L., Hsia, J., Hubbell, F. A., Jackson, R. D., Johnson, K. C., Kotchen, J. M., LaCroix, A. Z., Lane, D. S., Langer, R. D., Lasser, N. L., and Henderson, M. M. 2006. Low-fat dietary pattern and risk of invasive breast cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA* 295, 6, 629–642.
-

- [216] Preston, D. L., Mattsson, A., Holmberg, E., Shore, R., Hildreth, N. G., and Boice, J. D. 2002. Radiation effects on breast cancer risk: a pooled analysis of eight cohorts. *Radiation research* 158, 2, 220–235.
- [217] Prossnitz, E. R. and Barton, M. 2011. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature reviews. Endocrinology* 7, 12, 715–726.
- [218] Pschyrembel, Willibald, bearbeitet von der Pschyrembel-Redaktion. 2017. *Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch*. De Gruyter, Berlin, Boston.
- [219] Raffo, D., Pontiggia, O., Bal de Kier Joffé, E., and Simian, M. 2015. Non-genomic actions of estradiol and 4-OH-tamoxifen on murine breast cancer cells. *Oncology reports* 33, 1, 439–447.
- [220] Reese, J. M., Bruinsma, E. S., Monroe, D. G., Negron, V., Suman, V. J., Ingle, J. N., Goetz, M. P., and Hawse, J. R. 2017. ER β inhibits cyclin dependent kinases 1 and 7 in triple negative breast cancer. *Oncotarget* 8, 57, 96506–96521.
- [221] Reese, J. M., Suman, V. J., Subramaniam, M., Wu, X., Negron, V., Gingery, A., Pitel, K. S., Shah, S. S., Cunliffe, H. E., McCullough, A. E., Pockaj, B. A., Couch, F. J., Olson, J. E., Reynolds, C., Lingle, W. L., Spelsberg, T. C., Goetz, M. P., Ingle, J. N., and Hawse, J. R. 2014. ER β 1: characterization, prognosis, and evaluation of treatment strategies in ER α -positive and -negative breast cancer. *BMC cancer* 14, 749.
- [222] Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., and Aggarwal, B. B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free radical biology & medicine* 49, 11, 1603–1616.
- [223] Ribeiro, L. F., Peralta-Zamora, P. G., Maia, B. H. L. N. S., Ramos, L. P., and Pereira-Netto, A. B. 2013. Prediction of linolenic and linoleic fatty acids content in flax seeds and flax seeds flours through the use of infrared reflectance spectroscopy and multivariate calibration. *Food Research International* 51, 2, 848–854.
- [224] Rickard, S. E., Yuan, Y. V., and Thompson, L. U. 2000. Plasma insulin-like growth factor I levels in rats are reduced by dietary supplementation of flaxseed or its lignan secoisolariciresinol diglycoside. *Cancer letters* 161, 1, 47–55.
- [225] Riggs, B. L. and Hartmann, L. C. 2003. Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *The New England journal of medicine* 348, 7, 618–629.
- [226] Rivenzon-Segal, D., Boldin-Adamsky, S., Seger, D., Seger, R., and Degani, H. 2003. Glycolysis and glucose transporter 1 as markers of response to hormonal therapy in breast cancer. *Int. J. Cancer* 107, 2, 177–182.

- [227] Robert, N. J., Diéras, V., Glaspy, J., Brufsky, A. M., Bondarenko, I., Lipatov, O. N., Perez, E. A., Yardley, D. A., Chan, S. Y. T., Zhou, X., Phan, S.-C., and O'Shaughnessy, J. 2011. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 10, 1252–1260.
- [228] Robert Koch-Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2017. *Krebs in Deutschland für 2013/2014*, Berlin.
- [229] Roche Applied Science. 2005. *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)*. Version July 2005.
- [230] Roche Applied Science. 2007. *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)*. Version August 2007.
- [231] Roger, P., Sahla, M. E., Mäkelä, S., Gustafsson, J. A., Baldet, P., and Rochefort, H. 2001. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer research* 61, 6, 2537–2541.
- [232] Romond, E. H., Perez, E. A., Bryant, J., Suman, V. J., Geyer, C. E., Davidson, N. E., Tan-Chiu, E., Martino, S., Paik, S., Kaufman, P. A., Swain, S. M., Pisansky, T. M., Fehrenbacher, L., Kutteh, L. A., Vogel, V. G., Visscher, D. W., Yothers, G., Jenkins, R. B., Brown, A. M., Dakhil, S. R., Mamounas, E. P., Lingle, W. L., Klein, P. M., Ingle, J. N., and Wolmark, N. 2005. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine* 353, 16, 1673–1684.
- [233] Saarinen, N. M., Abrahamsson, A., and Dabrosin, C. 2010. Estrogen-induced angiogenic factors derived from stromal and cancer cells are differently regulated by enterolactone and genistein in human breast cancer in vivo. *International journal of cancer* 127, 3, 737–745.
- [234] Saarinen, N. M., Power, K., Chen, J., and Thompson, L. U. 2006. Flaxseed attenuates the tumor growth stimulating effect of soy protein in ovariectomized athymic mice with MCF-7 human breast cancer xenografts. *International journal of cancer* 119, 4, 925–931.
- [235] Saladores, P., Mürdter, T., Eccles, D., Chowbay, B., Zgheib, N. K., Winter, S., Ganchev, B., Eccles, B., Gerty, S., Tfayli, A., Lim, J. S. L., Yap, Y. S., Ng, R. C. H., Wong, N. S., Dent, R., Habbal, M. Z., Schaeffeler, E., Eichelbaum, M., Schroth, W., Schwab, M., and Brauch, H. 2015. Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. *The pharmacogenomics journal* 15, 1, 84–94.
- [236] Schmitz, S. 2011. *Der Experimentator: Zellkultur*. Experimentator. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
-

- [237] Schröder, L., Koch, J., Mahner, S., Kost, B. P., Hofmann, S., Jeschke, U., Haumann, J., Schmedt, J., and Richter, D. U. 2017. The Effects of Petroselinum Crispum on Estrogen Receptor-positive Benign and Malignant Mammary Cells (MCF12A/MCF7). *Anticancer research* 37, 1, 95–102.
- [238] Schüler-Toprak, S., Häring, J., Inwald, E. C., Moehle, C., Ortmann, O., and Treeck, O. 2016. Agonists and knockdown of estrogen receptor β differentially affect invasion of triple-negative breast cancer cells in vitro. *BMC cancer* 16, 1, 951.
- [239] Seegers, J. C., Aveling, M. L., van Aswegen, C. H., Cross, M., Koch, F., and Joubert, W. S. 1989. The cytotoxic effects of estradiol-17 beta, catecholestradiols and methoxyestradiols on dividing MCF-7 and HeLa cells. *Journal of Steroid Biochemistry* 32, 6, 797–809.
- [240] Seibold, P., Vrieling, A., Johnson, T. S., Buck, K., Behrens, S., Kaaks, R., Linseisen, J., Obi, N., Heinz, J., Flesch-Janys, D., and Chang-Claude, J. 2014. Enterolactone concentrations and prognosis after postmenopausal breast cancer: assessment of effect modification and meta-analysis. *International journal of cancer* 135, 4, 923–933.
- [241] Setchell, K.D.R., Borriello, S. P., Gordon, H., Lawson, A. M., Harkness, R., Morgan, D.M.L., Kirk, D. N., Adlercreutz, H., Anderson, L. C., and Axelson, M. 1981. LIGNAN FORMATION IN MAN—MICROBIAL INVOLVEMENT AND POSSIBLE ROLES IN RELATION TO CANCER. *The Lancet* 318, 8236, 4–7.
- [242] Shaaban, A. M., O'Neill, P. A., Davies, M. P. A., Sibson, R., West, C. R., Smith, P. H., and Foster, C. S. 2003. Declining estrogen receptor-beta expression defines malignant progression of human breast neoplasia. *The American journal of surgical pathology* 27, 12, 1502–1512.
- [243] Shimizu, H., Ross, R. K., Bernstein, L., Yatani, R., Henderson, B. E., and Mack, T. M. 1991. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* 63, 6, 963–966.
- [244] Shin, H.-R., Joubert, C., Boniol, M., Hery, C., Ahn, S. H., Won, Y.-J., Nishino, Y., Sobue, T., Chen, C.-J., You, S.-L., Mirasol-Lumague, M. R., Law, S. C.-K., Mang, O., Xiang, Y.-B., Chia, K.-S., Rattanamongkolgul, S., Chen, J.-G., Curado, M. P., and Autier, P. 2010. Recent trends and patterns in breast cancer incidence among Eastern and Southeastern Asian women. *Cancer causes & control : CCC* 21, 11, 1777–1785.
- [245] Shu, X. O., Zheng, Y., Cai, H., Gu, K., Chen, Z., Zheng, W., and Lu, W. 2009. Soy food intake and breast cancer survival. *JAMA* 302, 22, 2437–2443.

- [246] Sieri, S., Chiodini, P., Agnoli, C., Pala, V., Berrino, F., Trichopoulou, A., Benetou, V., Vasilopoulou, E., Sánchez, M.-J., Chirlaque, M.-D., Amiano, P., Quirós, J. R., Ardanaz, E., Buckland, G., Masala, G., Panico, S., Grioni, S., Sacerdote, C., Tumino, R., Boutron-Ruault, M.-C., Clavel-Chapelon, F., Fagherazzi, G., Peeters, P. H. M., van Gils, C. H., Bueno-de-Mesquita, H. B., van Kranen, H. J., Key, T. J., Travis, R. C., Khaw, K. T., Wareham, N. J., Kaaks, R., Lukanova, A., Boeing, H., Schütze, M., Sonestedt, E., Wirfält, E., Sund, M., Andersson, A., Chajes, V., Rinaldi, S., Romieu, I., Weiderpass, E., Skeie, G., Dagrun, E., Tjønneland, A., Halkjær, J., Overvad, K., Merrett, M. A., Cox, D., Riboli, E., and Krogh, V. 2014. Dietary fat intake and development of specific breast cancer subtypes. *Journal of the National Cancer Institute* 106, 5.
- [247] Sieri, S., Krogh, V., Ferrari, P., Berrino, F., Pala, V., Thiébaud, A. C. M., Tjønneland, A., Olsen, A., Overvad, K., Jakobsen, M. U., Clavel-Chapelon, F., Chajes, V., Boutron-Ruault, M.-C., Kaaks, R., Linseisen, J., Boeing, H., Nöthlings, U., Trichopoulou, A., Naska, A., Lagiou, P., Panico, S., Palli, D., Vineis, P., Tumino, R., Lund, E., Kumle, M., Skeie, G., González, C. A., Ardanaz, E., Amiano, P., Tormo, M. J., Martínez-García, C., Quirós, J. R., Berglund, G., Gullberg, B., Hallmans, G., Lenner, P., Bueno-de-Mesquita, H. B., van Duijnhoven, Fränzel J B, Peeters, P. H. M., van Gils, C. H., Key, T. J., Crowe, F. L., Bingham, S., Khaw, K. T., Rinaldi, S., Slimani, N., Jenab, M., Norat, T., and Riboli, E. 2008. Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *The American journal of clinical nutrition* 88, 5, 1304–1312.
- [248] Sies, H. 1991. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine* 91, 3, S31-S38.
- [249] Sirotkin, A. V. and Harrath, A. H. 2014. Phytoestrogens and their effects. *European journal of pharmacology* 741, 230–236.
- [250] Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., and Norton, L. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England journal of medicine* 344, 11, 783–792.
- [251] Smeds, A. I., Eklund, P. C., Sjöholm, R. E., Willför, S. M., Nishibe, S., Deyama, T., and Holmbom, B. R. 2007. Quantification of a broad spectrum of lignans in cereals, oilseeds, and nuts. *Journal of agricultural and food chemistry* 55, 4, 1337–1346.
- [252] Smeds, A. I., Eklund, P. C., and Willför, S. M. 2012. Content, composition, and stereochemical characterisation of lignans in berries and seeds. *Food chemistry* 134, 4, 1991–1998.
-

- [253] Smith-Warner, S. A., Spiegelman, D., Yaun, S.-S., van den Brandt, Piet A., Folsom, A. R., Goldbohm, R. A., Graham, S., Holmberg, L., Howe, G. R., Marshall, J. R., Miller, A. B., Potter, J. D., Speizer, F. E., Willett, W. C., Wolk, A., and Hunter, D. J. 1998. Alcohol and Breast Cancer in Women. *JAMA* 279, 7, 535.
- [254] Stewart, B. W., Ed. 2014. *World cancer report 2014*. International Agency for Research in Cancer, Lyon.
- [255] Strater, N. 2011. *Der Einfluss von Leinwurzelextrakten der Pflanze *Linum usitatis-simum* unterschiedlicher Alterstufen auf die Vitalität verschiedener Mammakarzinom-zelllinien*. Inauguraldissertation. Universität Rostock.
- [256] Ström, A., Hartman, J., Foster, J. S., Kietz, S., Wimalasena, J., and Gustafsson, J.-A. 2004. Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6, 1566–1571.
- [257] Suzuki, R., Orsini, N., Saji, S., Key, T. J., and Wolk, A. 2009. Body weight and incidence of breast cancer defined by estrogen and progesterone receptor status--a meta-analysis. *International journal of cancer* 124, 3, 698–712.
- [258] Swain, S. M., Baselga, J., Kim, S.-B., Ro, J., Semiglazov, V., Campone, M., Ciruelos, E., Ferrero, J.-M., Schneeweiss, A., Heeson, S., Clark, E., Ross, G., Benyunes, M. C., and Cortés, J. 2015. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine* 372, 8, 724–734.
- [259] Szatrowski, T. P. and Nathan, C. F. 1991. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer research* 51, 3, 794–798.
- [260] Tan, K. P., Chen, J., Ward, W. E., and Thompson, L. U. 2004. Mammary Gland Morphogenesis is Enhanced by Exposure to Flaxseed or Its Major Lignan During Suckling in Rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 229, 2, 147–157.
- [261] Tan, W., Li, Q., Chen, K., Su, F., Song, E., and Gong, C. 2016. Estrogen receptor beta as a prognostic factor in breast cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 7, 9, 10373–10385.
- [262] Tempfer, C. B., Froese, G., Heinze, G., Bentz, E.-K., Hefler, L. A., and Huber, J. C. 2009. Side effects of phytoestrogens: a meta-analysis of randomized trials. *The American Journal of Medicine* 122, 10, 939-46.e9.
- [263] Tham, D. M., Gardner, C. D., and Haskell, W. L. 1998. Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83, 7, 2223–2235.

- [264] Thanos, J., Cotterchio, M., Boucher, B. A., Kreiger, N., and Thompson, L. U. 2006. Adolescent dietary phytoestrogen intake and breast cancer risk (Canada). *Cancer causes & control : CCC* 17, 10, 1253–1261.
- [265] The Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. 2002. Endogenous Sex Hormones and Breast Cancer in Postmenopausal Women. Reanalysis of Nine Prospective Studies. *CancerSpectrum Knowledge Environment* 94, 8, 606–616.
- [266] Theil, C. A. 2011. *Untersuchungen zum Einfluss eines Linum usitatissimum-Wurzelextrakts auf zwei verschiedene Mammakarzinom-Zelllinien im Vergleich mit Genistein, Genistin, Daidzein, Daidzin, Secoisolariciresinol, Tamoxifen und 17 β -Estradiol*. Inauguraldissertation. Universität Rostock.
- [267] ThermoFisher Scientific. *HMEC*. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/technical-resources/faq/Cell-Culture/Primary-Cells/1043034551/What-are-typical-doubling-times-for-Human-Mammary-Epithelial-Cells-HMEC.htm>. Accessed 24 January 2019.
- [268] Thieme via medici. 2018. *Brustdrüse (Mamma)*. <https://viamedici.thieme.de/lernmodule/histologie/brustdr%C3%BCse+mamma>. Accessed 21 September 2018.
- [269] Thompson, L. U., Boucher, B. A., Liu, Z., Cotterchio, M., and Kreiger, N. 2006. Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestan. *Nutrition and cancer* 54, 2, 184–201.
- [270] Thompson, L. U., Chen, J. M., Li, T., Strasser-Weippl, K., and Goss, P. E. 2005. Dietary flaxseed alters tumor biological markers in postmenopausal breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 10, 3828–3835.
- [271] Todorova, V. K., Kaufmann, Y., Luo, S., and Klimberg, V. S. 2011. Tamoxifen and raloxifene suppress the proliferation of estrogen receptor-negative cells through inhibition of glutamine uptake. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 67, 2, 285–291.
- [272] Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 65, 2, 87–108.
- [273] Tou, J. C.L. and Thompson, L. U. 1999. Exposure to flaxseed or its lignan component during different developmental stages influences rat mammary gland structures. *Carcinogenesis* 20, 9, 1831–1835.
- [274] Trédan, O., Galmarini, C. M., Patel, K., and Tannock, I. F. 2007. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *CancerSpectrum Knowledge Environment* 99, 19, 1441–1454.
- [275] Treeck, O., Lattrich, C., Springwald, A., and Ortmann, O. 2010. Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res Treat* 120, 3, 557–565.

- [276] Turati, F., Carioli, G., Bravi, F., Ferraroni, M., Serraino, D., Montella, M., Giacosa, A., Toffolutti, F., Negri, E., Levi, F., and La Vecchia, C. 2018. Mediterranean Diet and Breast Cancer Risk. *Nutrients* 10, 3.
- [277] Uhl, A. 2009. *Die konzentrationsabhängige Wirkung der lignanangereicherten Rohextrakte aus dem Leinsamen *Linum usitatissimum* und dem Kürbiskern aus dem Gartenkürbis *Cucurbita pepo* auf die Proliferation von Mammacarcinomzellen in-vitro*. Inauguraldissertation. Universität Rostock.
- [278] van den Brandt, P. A. 2000. Pooled Analysis of Prospective Cohort Studies on Height, Weight, and Breast Cancer Risk. *American Journal of Epidemiology* 152, 6, 514–527.
- [279] Vara-Messler, M., Pasqualini, M. E., Comba, A., Silva, R., Buccellati, C., Trenti, A., Trevisi, L., Eynard, A. R., Sala, A., Bolego, C., and Valentich, M. A. 2017. Increased dietary levels of α -linoleic acid inhibit mammary tumor growth and metastasis. *European journal of nutrition* 56, 2, 509–519.
- [280] Vector Laboratories, I. 2015. *ImmPRESS™ UNIVERSAL REAGENT (MP-7500)*. <https://vectorlabs.com/media/docs/protocols/MP-7500.pdf>.
- [281] Vessey, M. and Painter, R. 2006. Oral contraceptive use and cancer. Findings in a large cohort study, 1968-2004. *British journal of cancer* 95, 3, 385–389.
- [282] Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., and Marc, J. 2014. The many faces of estrogen signaling. *Biochemia medica* 24, 3, 329–342.
- [283] Waaseth, M., Bakken, K., Dumeaux, V., Olsen, K. S., Rylander, C., Figenschau, Y., and Lund, E. 2008. Hormone replacement therapy use and plasma levels of sex hormones in the Norwegian Women and Cancer postgenome cohort - a cross-sectional analysis. *BMC women's health* 8, 1.
- [284] Wang, C. and Kurzer, M. S. 1997. Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutrition and cancer* 28, 3, 236–247.
- [285] Wang, L., Chen, J., and Thompson, L. U. 2005. The inhibitory effect of flaxseed on the growth and metastasis of estrogen receptor negative human breast cancer xenografts attributed to both its lignan and oil components. *International journal of cancer* 116, 5, 793–798.
- [286] Ward, W. E., Jiang, F. O., and Thompson, L. U. 2000. Exposure to flaxseed or purified lignan during lactation influences rat mammary gland structures. *Nutrition and cancer* 37, 2, 187–192.
- [287] Weichselbaum, R. R., Hellman, S., Piro, A. J., Nove, J. J., and Little, J. B. 1978. Proliferation kinetics of a human breast cancer line in vitro following treatment with 17 β -estradiol and 1- β -D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer research* 38, 8, 2339–2342.

- [288] Welshons, W. V., Murphy, C. S., Koch, R., Calaf, G., and Jordan, V. C. 1987. Stimulation of breast cancer cells in vitro by the environmental estrogen enterolactone and the phytoestrogen equol. *Breast cancer research and treatment* 10, 2, 169–175.
- [289] Wendler, A., Albrecht, C., and Wehling, M. 2012. Nongenomic actions of aldosterone and progesterone revisited. *Steroids* 77, 10, 1002–1006.
- [290] Weu-Domschke, S. 2018. *Wirkung phytoestrogenhaltiger Leinwurzelextrakte (Linum usitatissimum) auf maligne und benigne Zelllinien der Mamma*. Inauguraldissertation. Universität Rostock.
- [291] Wiggins, A. K. A., Kharotia, S., Mason, J. K., and Thompson, L. U. 2015. α -Linolenic Acid Reduces Growth of Both Triple Negative and Luminal Breast Cancer Cells in High and Low Estrogen Environments. *Nutrition and cancer* 67, 6, 1001–1009.
- [292] Williams, C., Edvardsson, K., Lewandowski, S. A., Ström, A., and Gustafsson, J.-A. 2008. A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. *Oncogene* 27, 7, 1019–1032.
- [293] Woolcott, C. G., SenGupta, S. K., Hanna, W. M., and Aronson, K. J. 2008. Estrogen and progesterone receptor levels in nonneoplastic breast epithelium of breast cancer cases versus benign breast biopsy controls. *BMC cancer* 8, 130.
- [294] World Cancer Research Fund International and American Institute for Cancer Research, Eds. 2018. *The cancer process. Continuous Update Project Expert Report 2018*.
- [295] World Health Organisation. 2018. *Cancer prevention*. <http://www.who.int/cancer/prevention/en/>. Accessed 20 September 2018.
- [296] Wu, A. H. 2002. Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Carcinogenesis* 23, 9, 1491–1496.
- [297] Wu, A. H., Yu, M. C., Tseng, C.-C., and Pike, M. C. 2008. Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. *British journal of cancer* 98, 1, 9–14.
- [298] Wu, S., Powers, S., Zhu, W., and Hannun, Y. A. 2016. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature* 529, 7584, 43–47.
- [299] Wu, X., Subramaniam, M., Grygo, S. B., Sun, Z., Negron, V., Lingle, W. L., Goetz, M. P., Ingle, J. N., Spelsberg, T. C., and Hawse, J. R. 2011. Estrogen receptor-beta sensitizes breast cancer cells to the anti-estrogenic actions of endoxifen. *Breast cancer research : BCR* 13, 2, R27.
- [300] Xiong, X.-Y., Hu, X.-J., Li, Y., and Liu, C.-M. 2015. Inhibitory Effects of Enterolactone on Growth and Metastasis in Human Breast Cancer. *Nutrition and cancer* 67, 8, 1324–1332.
- [301] Yan, L. and Spitznagel, E. L. 2009. Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of a meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition* 89, 4, 1155–1163.
-

- [302] Zamora-Ros, R., Knaze, V., Luján-Barroso, L., Kuhnle, G. G. C., Mulligan, A. A., Touillaud, M., Slimani, N., Romieu, I., Powell, N., Tumino, R., Peeters, P. H. M., Magistris, M. S. de, Ricceri, F., Sonestedt, E., Drake, I., Hjartåker, A., Skie, G., Mouw, T., Wark, P. A., Romaguera, D., Bueno-de-Mesquita, H. B., Ros, M., Molina, E., Sieri, S., Quirós, J. R., Huerta, J. M., Tjønneland, A., Halkjær, J., Masala, G., Teucher, B., Kaas, R., Travis, R. C., Dilis, V., Benetou, V., Trichopoulou, A., Amiano, P., Ardanaz, E., Boeing, H., Förster, J., Clavel-Chapelon, F., Fagherazzi, G., Perquier, F., Johansson, G., Johansson, I., Cassidy, A., Overvad, K., and González, C. A. 2012. Dietary intakes and food sources of phytoestrogens in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) 24-hour dietary recall cohort. *European journal of clinical nutrition* 66, 8, 932–941.
- [303] Zeeck, S. C. and Grond, S. 2017. *Chemie für Mediziner*. Urban & Fischer in Elsevier, München.
- [304] Zeleniuch-Jacquotte, A., Adlercreutz, H., Shore, R. E., Koenig, K. L., Kato, I., Arslan, A. A., and Toniolo, P. 2004. Circulating enterolactone and risk of breast cancer: a prospective study in New York. *British journal of cancer* 91, 1, 99–105.
- [305] Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch Instituts. 2017. *Brustkrebs (Mammakarzinom)*. <https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs.html>. Accessed 15 September 2018.
- [306] Zhan, T., Digel, M., Küch, E.-M., Stremmel, W., and Füllekrug, J. 2011. Silybin and dehydrosilybin decrease glucose uptake by inhibiting GLUT proteins. *Journal of cellular biochemistry* 112, 3, 849–859.
- [307] Zheng, A., Kallio, A., and Härkönen, P. 2007. Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. *Endocrinology* 148, 6, 2764–2777.
- [308] Ziegler, R. G., Hoover, R. N., Pike, M. C., Hildesheim, A., Nomura, A. M. Y., West, D. W., Wu-Williams, A. H., Kolonel, L. N., Horn-Ross, P. L., Rosenthal, J. F., and Hyer, M. B. 1993. Migration Patterns and Breast Cancer Risk in Asian-American Women. *JNCI/ Journal of the National Cancer Institute* 85, 22, 1819–1827.

X. ANHANG

Tab. 3: Zelllinien

HMEC (CC-2551)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Hs 578T (ATCC® HTB126™)	ACCT- LCG Standards GmbH, Wesel, Deutschland
MCF-12A (ATCC® CRL10782™)	ACCT- LCG Standards GmbH, Wesel, Deutschland

Tab. 4: Nährmedien und Zusätze

Amphotericin B (250 µg/ml)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's MEM	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium	c.c.pro GmbH, Oberdorla, Deutschland
Fetales Kälber Serum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
HAM'S F-12	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Pferdeserum	c.c.pro GmbH, Oberdorla, Deutschland
Insulin	c.c.pro GmbH, Oberdorla, Deutschland
Mammary Epithelial Cell Supplement	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mammary Epithelial Cell Basal Medium (prf)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Tab. 5: Test- und Kontrollsubstanzen

17-β-Estradiol ≥ 98 % CAS: 50-28-2, M 272,38 g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Enterodiol ≥ 95.0 % (HPLC) CAS: 80226-00-2, M 302,36 g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Enterolactone ~ 95 % (HPLC) CAS: 78473-71-9, M 298,33 g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol absolut >99,5 %, Ph. Eur., reinst	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Matairesinol ≥ 85 % (HPLC) CAS: 580-72-3, M 358,39 g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Secoisolariciresinol ≥ 95.0 % (HPLC) CAS: 29388-59-8, M 362, 42 g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tamoxifen ≥ 99 % CAS: 10540-29-1, M 371.51 g/mol	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Triton [™] X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Tab. 6: Chemikalien, Puffer und Lösungen

Aqua	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany
Formafix 4 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glukose Systemlösung	CARE diagnostica Laborreagenzien GmbH, Voderde, Deutschland
Orion Application Solution pH 4.01, 7.00 und 10.01 Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts
Orion Application Solution pH Electrode Storage Solution	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts
PBS (phosphatgepufferte NaCl-Lösung), pH 7,4, 10 mM (8,0 g Natriumchlorid + 2,9 g Natriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O + 0,2 g Natriumhydrogenphosphat + 0,2 g Kaliumchlorid in 1,0 l destilliertes Wasser)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Salzsäure (HCL) 1 N	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) 1 M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blue Solution 0,4 %	Gibco [™] , Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts
Trypsin-EDTA 10x	c.c.pro GmbH, Oberdorla, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 35 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 7: Test-Kits

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric):	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Histoprime HRP- Substrate LinRed IHC	LINARIS Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, Deutschland
Hydrogen Peroxide Colorimetric/Fluorometric Assay Kit:	BioVision Incorporated, Kalifornien, USA

ImmPRESS™ UNIVERSAL REAGENT KIT (MP-7500)	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA
---	--

Tab. 8: Antikörper

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor Clone PgR 636	Dako, Aglient Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornien
Mouse anti estrogen receptor beta 1 MCA1974	Serotec, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Novocastra Liquid Mouse Monoclonal Antibody Estrogen Receptor alpha NCL-ER-6F11/2	Leica Biosystems GmbH, Nußloch, Deutschland

Tab. 9: Verbrauchsmaterialien

Aspirationspipetten 2 ml, 10 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Cellstar Tubes 50 ml	Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Gewerbekulturflasche mit Filterschraubverschluss 25 cm ²	Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Kryo-Röhrchen 2,0 ml	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Pipette Tip Universal 200 µl	Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitze 1000 µl, 10 µl	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co. Nümbrecht, Deutschland
Reaction Tubes 1,5 ml	Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellenzählkammer nach Bürker	Poly-Optik, Bad Blankenburg, Deutschland
Zellkultur Microplatte 96 Well	Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflasche mit Filter-Schraubverschluss 75cm ² , 175 cm ²	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturtestplatte 24 Well	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

Tab. 10: Geräte

Brutschrank Function Line	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Gefrierschrank Herafreeze	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Glukosemessgerät ecoTwenty	CARE diagnostica Laborreagenzien GmbH, Voderde, Deutschland
Kamera Axiostar plus	Carl Zeiss Werk, Göttingen, Deutschland
Microplate Reader Model 680	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mikroskop Olympus CK2-TR	Olympus Europa GmbH, Hamburg, Deutschland
ORION 3 STAR Benchtop pH meter	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts
Präzisionswaage Sartorius Basic	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Sterilbox Heraeus HERAsafe™	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Vortex-1 Genie Touch Mixer	Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York
Zentrifuge Heraeus BIOFUGE pico	Kendro Laboratory Products, Osterode, Germany
Zentrifuge Universal 320 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

Tab. 11: Software

Citavi 6, Literaturverwaltung	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz
Microplate Manager	Bio- Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, Washington
SPSS Statistics 25	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland

XI. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Berlin

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

XII. DANKSAGUNG

Für die vielfältige Unterstützung zahlreicher Personen möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken.

Allen voran gilt mein Dank meiner Betreuerin Frau PD Dr. rer. nat. habil. Dagmar-Ulrike Richter, Leiterin des Forschungslabores der Universitätsfrauenklinik Rostock, für die unerschöpfliche Unterstützung, die wertvollen fachlichen Anregungen und die konstruktive Kritik während des gesamten Forschungsprojektes. Ihr professioneller Rat trug maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. habil. Volker Briesse für die Bereitstellung des hochinteressanten Themas.

Zudem möchte ich dem gesamten Team und meinen Mitdoktoranden des Forschungslabors der UFK, insbesondere Frau E. Greschkowitz, Frau Bianca Gosch und Dipl.-Biol. Marlen Szewczyk, für die Bereitstellung der Materialien und die mühevollen sowohl fachliche als auch moralische Unterstützung meinen großen Dank aussprechen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Anne Hornung aus dem Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung Rostock für die geduldige Hilfestellung bei der statistischen Aufarbeitung meiner Daten.

Ebenso danke ich von Herzen meiner engsten Vertrauten Anna Krebs, meinem Partner und meinen lieben Freunden für das Verständnis und die große emotionale Unterstützung über diesen langen Zeitraum sowie die mühevollen Durchsicht der Dissertation. Ohne euch wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt schließlich meinen Eltern, deren liebevolle Worte und uneingeschränkter Rückhalt meinen bisherigen Lebensweg stets begleitet haben. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.